VOLTAGE-CLAMP UNTERSUCHUNGEN ZUR KALIUMLEITFÄHIGKEIT DER SKELETTMUSKELFASER DES FROSCHES

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Erich Wettwer

Bochum 1981

VOLTAGE-CLAMP UNTERSUCHUNGEN ZUR KALIUMLEITFÄHIGKEIT DER SKELETTMUSKELFASER DES FROSCHES

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Erich Wettwer

Bochum 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Das Kalium-Leitfähigkeitssystem der Frosch-Skelettmuskelfaser	2
1.1.1.	Kalium-Selektivität	4
1.1.2.	Pharmakologische Differenzierung	5
1.2.	Die hohe Kaliumleitfähigkeit stoffwechselvergifteter und erschöpfter Skelettmuskelfasern	8
2.	Methodik	14
2.1.	Präparate	14
2.2.	Lösungen	14
2.3.	Methodik der Stoffwechselvergiftung und Erschöpfung	17
2.4.	Versuchsaufbau	19
2.5.	Annahmen und Berechnungen zur Abschätzung der Stoffmengen und Konzentrationsverteilung intrazellulär applizierter Substanzen	24
2.5.1.	Berechnung der injizierten Stoffmengen an EGTA und Ca-EGTA	24
2.5.1.1.	Experimentelle Bestimmung der Transportzahl für Ca-EGTA (bzw. EGTA)	27
2.5.2.	Konzentrationsverteilung der injizierten Stoffmengen an EGTA bzw. Ca-EGTA - Diffusionsmodell	28
2.5.3.	Änderung der freien intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration nach EGTA bzw. Ca-EGTA Injektionen	31
2.5.4.	Abschätzungen und Berechnungen der injizierten Stoffmengen an 4-AP und TEA und der intrazellulären Konzentration nach Injektion	33

		Seite
3.	Ergebnisse	35
3.1.	Die extra- und intrazelluläre Wirkung von 4-Aminopyridin und Tetraethylammonium auf die Kaliumleitfähigkeit, insbesondere die des verzögerten Gleichrichters normaler Skelettmuskelfasern	35
3.1.1.	Die Wirkung von extrazellulär zugegebenem 4-Aminopyridin auf die verzögerte Gleichrichtung	35
3.1.2.	Wirkungseintritt und Reversibilität der 4-AP Wirkung - Kontraktionskraftmessungen an Einzelfaserpräparaten nach der Zugabe von 4-AP	41
3.1.3.	Die Wirkung von 4-AP auf den Einwärtsgleichrichter	45
3.1.4.	Die Wirkungen von 2- und 3-Aminopyridin	47
3.1.5.	Die Wirkung von 4-Aminopyridin auf den verzögerten Gleichrichter bei Injektion des Blockers ins Sarkoplasma	52
3.1.5.1.	Reaktionskinetik der 4-AP Wirkung	61
3.1.6.	Die Wirkung von TEA auf die verzögerte Gleichrichtung nach intrazellulärer Zugabe des Blockers	69
3.2.	Untersuchungen zur hohen Kaliumleitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern	77
3.2.1.	Reversibilität von Kontraktilität und Membranleitfähigkeitserhöhung - Der intermediäre Erschöpfungszustand	77
3.2.2.	Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration durch EGTA-Injektionen	81
3.2.2.1.	Kontraktionsschwellenverschiebung normaler Skelettmuskelfasern nach EGTA-Injektionen	81
3.2.2.2.	Die Wirkung von EGTA-Injektionen auf die Membranleitfähigkeit im intermediären Zustand der Erschöpfung	86

Seite

3.2.2.3. Konzentrationsverteilung von EGTA und intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration nach EGTA-Injektionen 91

3.2.3. Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration durch Coffein und Ca-EGTA Injektionen 94

3.2.3.1. Die Wirkung von Coffein auf die Membranleitfähigkeit im intermediären Zustand der Erschöpfung 94

3.2.3.2. Die Wirkungen von Ca-EGTA Injektionen auf die Membranleitfähigkeit im intermediären Zustand der Erschöpfung 97

3.2.3.3. Konzentrationsverteilung von Ca-EGTA und intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration nach Ca-EGTA Injektionen 100

3.2.4. Die Entstehung von "tail"-Strömen im intermediären Zustand der Erschöpfung 103

4. Diskussion 106

4.1. Extra- und intrazelluläre Wirkung von Aminopyridinen und Tetraethylammonium auf die Kaliumleitfähigkeit normaler Skelettmuskelfasern 106

4.1.1. Die intrazelluläre Wirkung von 4-Aminopyridin und TEA auf den verzögerten Gleichrichter 106

4.1.2. Die extrazelluläre Wirkung von Aminopyridinen und TEA auf die Membranleitfähigkeit der Skelettmuskelfaser 113

4.2. Die hohe Membranleitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern 117

4.2.1. Die Membranleitfähigkeit vollkommen erschöpfter Muskelfasern (Z3) 117

4.2.2. Die Membranleitfähigkeit im intermediären Zustand 120

4.2.3. Membranströme nach Coffeinzugabe und Ca-EGTA Injektionen 122

4.2.4. Ca^{2+}-induzierte Kaliumleitfähigkeit in Skelettmuskelfasern? 125

		Seite
4.2.5.	Der Einfluß des Energiestoffwechsels auf die hohe Kaliumleitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern	126
4.2.6.	Ca^{2+}-induzierte Kalium-Leitfähigkeitserhöhung an Erythrozyten: Ein Modell für die hohe Kaliumleitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern	128
5.	Zusammenfassung	132
6.	Literaturverzeichnis	136

1. Einleitung

Die Ursache der Entstehung und Ausbreitung von Aktionspotentialen sind Leitfähigkeitsänderungen der Zellmembran für Natrium- und Kaliumionen.
Dies gilt für die überwiegende Anzahl erregbarer Zellen. Während jedoch durch Na^+-Leitfähigkeitsänderungen im wesentlichen nur Auslösung und Fortleitung des Aktionspotentials gesteuert werden, übernimmt das System der Kaliumleitfähigkeitskomponenten vielseitige Aufgaben in der Modifikation des Erregungszustandes. So bestimmt hauptsächlich die Kaliumleitfähigkeit den Ruhezustand der erregbaren Membran, bewirkt die Repolarisation des Aktionspotentials oder regelt Schrittmacherfunktionen (NOBLE & TSIEN, 1968).

Auf der Grundlage der Ionentheorie der Erregung rekonstruierten HODGKIN und HUXLEY (1952) das Aktionspotential mit Hilfe mathematischer Gleichungen. Sie gingen dabei von einer getrennten Beschreibung der Leitfähigkeitsänderungen für Natrium- und Kaliumionen aus, ohne eine wechselseitige Beeinflussung beider Prozesse anzunehmen. Eine Reihe von Experimenten deutete darauf hin, daß Na^+- und K^+-Leitfähigkeit räumlich getrennten und in ihrer Funktion unabhängigen Strukturen innerhalb der Membran zuzuordnen sind: Voltage-clamp Messungen zeigten ein deutlich verschiedenes Zeitverhalten der beiden Ionenströme, und beide Mechanismen besaßen unterschiedliche Ionenselektivitäten. Vor allem sprach aber die spezifische Blockierbarkeit der Ströme durch unterschiedliche Hemmstoffe für separate Ionenkanäle. Ein Musterbeispiel für die pharmakologische Differenzierung von Ionenkanälen stellen die Untersuchungen des Na^+-Kanals unter der Verwendung von Tetrodotoxin (TTX), dem hochspezifischen Gift der Kugelfische (Tetraodontidae) dar. Dem TTX in Wirkung und Spezifität sehr ähnlich ist das Saxitoxin, welches von einigen Dinoflagellaten produziert wird (NARAHASHI, 1974). Mit Hilfe von TTX konnte man die Dichte der Na^+-Kanäle in der Membran abschätzen. Für den Skelettmuskel des Frosches bestimmten ALMERS und LEVINSON (1975) 380 Kanäle

pro μm^2 Zellmembran einschließlich T-System und eine Einzelkanalleitfähigkeit von ca. 1 pS. Inzwischen ist es gelungen, die Leitfähigkeit von einzelnen Na^+-Kanälen direkt zu messen. SIGWORTH und NEHER (1980) ermittelten einen Wert von 18 pS für Na^+-Kanäle an embryonalen Muskelzellen der Ratte.

1.1. Das Kalium-Leitfähigkeitssystem der Frosch-Skelettmuskelfaser

Das Kalium-Leitfähigkeitssystem ist gegenüber dem Na^+-System weitaus komplizierter zusammengesetzt und sehr variabel je nach Tierart und Zelltyp. An Skelettmuskelfasern des Frosches, auf die sich die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit beschränken, erschweren überdies strukturelle Besonderheiten die Analyse des Kalium-Leitfähigkeitssystems: Bei einem Faserradius von 50 µm müssen 90 % der mit dem Extrazellulärraum direkt in Verbindung stehenden Oberfläche der Muskelmembran einem Kanälchensystem, dem transversalen tubulären System (T-System), zugeordnet werden, welches sich weit in das Innere der Muskelfaser verzweigt (PEACHEY & SCHILD, 1968). Die verschiedenen K^+-Leitfähigkeitskomponenten verteilen sich ungleichmäßig auf Oberflächen- und Tubulimembran.

Aufgrund von voltage-clamp Experimenten, Selektivitätsmessungen und pharmakologischer Differenzierung läßt sich die K^+-Leitfähigkeit der Skelettmuskelfaser des Frosches in drei Komponenten gliedern:

- den Einwärtsgleichrichter (inward rectifier, anomalous rectifier),
- den verzögerten Gleichrichter (delayed rectifier) und
- die langsame Komponente (slow component).

Der Einwärtsgleichrichter, die Kaliumleitfähigkeit der ruhenden Membran, besitzt für auswärtsgerichtete K^+-Ströme eine geringe, für einwärtsgerichtete K^+-Ströme dagegen eine hohe Leitfähigkeit (KATZ, 1949; HODGKIN & HOROWICZ, 1959). Diese Eigenschaft wird

besonders deutlich bei Verwendung von chloridfreien Badlösungen mit erhöhter Kaliumkonzentration. Bei einer großen treibenden Kraft für einen Einwärtsstrom von K^+-Ionen kann die K^+-Permeabilität 100 - 200 mal so groß werden wie für auswärtsgerichtete K^+-Ströme (HODGKIN & HOROWICZ, 1959; COSTANTIN, 1977). Da der Einwärtsgleichrichter entgegen der "constant-field" Gleichtung arbeitet, die bei niedriger K^+-Außenkonzentration eine auswärtsgerichtete Gleichrichtung fordert, spricht man auch von anomaler Gleichrichtung. Etwa 2/3 der Gesamt-Ruheleitfähigkeit entfallen auf die Membran des tubulären Systems (EISENBERG & GAGE, 1969). Die Kanäle des Einwärtsgleichrichters sind also sowohl in der Oberflächenmembran als auch in der Tubulimembran zu finden. Die Zuckungsmuskelfaser gehört zu den wenigen Präparaten, an denen eine anomale Gleichrichtung nachgewiesen wurde (ZACHAR, 1971).

Der verzögerte Gleichrichter wird erst bei Membranpotentialen positiver als -50 mV aktiviert (STANFIELD, 1970 b). Oberhalb der Schwelle kommt es zu einem verzögerten Anstieg der Kaliumleitfähigkeit, dessen Aktivierungskinetik mit dem Hodgkin-Huxley Formalismus beschrieben werden kann (s. auch Abb. 1 A). Er ist für die Repolarisation des Aktionspotentials und für das frühe Nachpotential verantwortlich. Der verzögerte Gleichrichter ist dem "late channel" des Riesenaxons des Tintenfisches analog,wird im Gegensatz zu diesem jedoch bei anhaltender Membrandepolarisation fast vollständig inaktiviert (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970 a). Nach den Untersuchungen von KIRSCH, NICHOLS und NAKAJIMA (1977) ist die Dichte der Kanäle des verzögerten Gleichrichters in der Membran des T-Systems geringer als in der Oberflächenmembran. Das Verhältnis könnte bei vorsichtiger Abschätzung etwa 1 : 5 betragen. Auch die Versuche von GAGE und EISENBERG (1969) mit abgekoppeltem T-System (Detubulierung) lassen vermuten, daß ein wesentlicher Anteil der Gesamtleitfähigkeit des verzögerten Gleichrichters in der Oberflächenmembran zu lokalisieren ist.

Während bei anhaltender Depolarisation der verzögerte Gleichrichter inaktiviert wird, nimmt die Leitfähigkeit der langsamen Komponente allmählich zu. Im Voltage-clamp Experiment überlagern sich die Membranströme beider K^+-Kanäle. Die langsame Komponente kann durch die Analyse einwärtsgerichteter "tail"-Ströme untersucht werden, die bei Repolarisation nach verschieden langen Depolarisationen auftreten. Bei 20° C erreicht sie nach ca. 2 s ein Leitfähigkeitsmaximum. Zu diesem Zeitpunkt ist der verzögerte Gleichrichter auf ca. 1/3 inaktiviert. Innerhalb von etwa 10 s nach Repolarisation fällt die Leitfähigkeit der langsamen Komponente wieder auf etwa 1/3 ihres Maximalwertes ab. Wegen ihres Zeitverhaltens sprechen ADRIAN, CHANDLER und HODGKIN (1970 b) der langsamen Komponente eine Rolle bei der Entstehung des späten Nachpotentials (late afterpotential) zu, das nach tetanischer Reizung des Muskels auftritt. Da das späte Nachpotential in detubulierten Fasern nicht mehr zu beobachten ist (GAGE & EISENBERG, 1969), lokalisierten ADRIAN, CHANDLER und HODGKIN (1970 b) den slow channel in der Membran des T-Systems. Die Entstehung des späten Nachpotentials durch Leitfähigkeitsänderungen eines K^+-Kanals ist jedoch umstritten. KIRSCH, NICHOLS und NAKAJIMA (1977) vermuteten auch in der T-Membran Kanäle des verzögerten Gleichrichters und nahmen an, daß ein Kalium-Ausstrom durch diese Kanäle zu einer Anreicherung im T-System führen und das späte Nachpotential hervorrufen könnte.

1.1.1. Kalium-Selektivität

Die beschriebenen drei K^+-Leitfähigkeitskomponenten haben unterschiedliche Selektivitäten für Kaliumionen. Der Einwärtsgleichrichter ist in hohem Maße kaliumselektiv: Na-Ionen sind 100-fach schlechter permeabel als K-Ionen (HODGKIN & HOROWICZ, 1959). Entsprechend liegt das Umkehrpotential des Einwärtsgleichrichters, das im wesentlichen das Ruhepotential bestimmt, nahe dem Kalium-Gleichgewichtspotential (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970 b).

Die K^+-Selektivität des verzögerten Gleichrichters ist mit einem Permeabilitätsverhältnis von $P_K : P_{Na} = 30 : 1$ erheblich geringer als die des Einwärtsgleichrichters (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970 a, GAY & STANFIELD, 1978). Das Gleichgewichtspotential des verzögerten Gleichrichters ist nach ADRIAN, CHANDLER und HODGKIN (1970 a) etwa 10 bis 15 mV positiver als das Ruhepotential. Man führt daher die Entstehung des frühen Nachpotentials beim Muskel-Aktionspotential auf ihn zurück. Die Selektivitätseigenschaften der langsamen Komponente sind bisher nicht untersucht worden. Da das Gleichgewichtspotential dieser Komponente in der Nähe des Ruhepotentials liegt, weist sie jedoch vermutlich eine höhere K^+-Selektivität auf als der verzögerte Gleichrichter (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970 b).

1.1.2. Pharmakologische Differenzierung

Mit Hilfe von blockierenden Substanzen läßt sich eine gewisse Trennung der drei Leitfähigkeitskomponenten erreichen. Jedoch gibt es wenige Stoffe, die spezifisch nur eine Komponente blokkieren. Das positiv geladene Tetraethylammonium-Ion (TEA) blockiert z. B. sowohl den Einwärtsgleichrichter als auch den verzögerten Gleichrichter (STANFIELD, 1970 a, b). Eine selektive Blockierung des Einwärtsgleichrichters wird mit niedrigen Konzentrationen von Formaldehyd (10 mM) erreicht (HUTTER, 1969; HUTTER & WILLIAMS, 1979). Die langsame Komponente scheint allen bekannten K^+-Kanalblockern gegenüber unempfindlich zu sein (STANFIELD, 1970 a, b; ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN 1970 b). Einige zweiwertige Ionen haben eine blockierende Wirkung auf die K^+-Leitfähigkeit der Skelettmuskelfaser. Zn-Ionen führen in geringen Konzentrationen (1 - 100 µM) zur Blockierung der verzögerten Gleichrichtung (STANFIELD, 1975), haben jedoch keinen Einfluß auf die K^+-Ruheleitfähigkeit der Membran. Ba- und Sr-Ionen führen zur Blockierung des Einwärtsgleichrichters (STANDEN & STANFIELD, 1980) ebenso die einwertigen Kationen Rb^+ und Cs^+ (ADRIAN, 1964; GAY & STANDFIELD, 1977).

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung der blockierenden Wirkung von 4-Aminopyridin nach extra- und intrazellulärer Zugabe sowie von TEA nach intrazellulärer Zugabe. TEA ist bislang das bestuntersuchte Molekül zur Blockierung der Kaliumleitfähigkeit erregbarer Zellen. Die halbmaximale Hemmung des K^+-Kanals durch TEA tritt allerdings erst bei wesentlich höheren Konzentrationen ein als die des Na^+-Kanals durch TTX; am Ranvier'schen Schnürring z. B. bei $4 \cdot 10^{-4}$ M TEA (HILLE, 1967) im Vergleich zu $1.2 \cdot 10^{-9}$ M STX (HILLE, 1968). TEA blockiert dennoch sehr spezifisch nur das Kaliumsystem, ohne die Na^+-Leitfähigkeit zu hemmen. Auch beeinflussen sich TEA und TTX bei gleichzeitiger Verwendung nicht in ihrer Wirksamkeit. Dies ist ein weiteres Argument für unterschiedliche und räumlich getrennte Wirkungsorte der Gifte und damit für getrennte Ionenkanäle. An den verschiedenen untersuchten Präparaten sind Wirksamkeit und Wirkungsort von TEA recht unterschiedlich. Am myelinisierten Nerven des Frosches ist TEA sowohl nach extrazellulärer (HILLE, 1967) als auch nach intrazellulärer Zugabe wirksam (ARMSTRONG & HILLE, 1972). Dagegen wirkt es am Riesenaxon des Tintenfisches nur intrazellulär (ARMSTRONG & BINSTOCK, 1965).

Der Einfluß von TEA auf die Kaliumleitfähigkeit der Frosch-Skelettmuskelfaser wurde von STANFIELD (1970 a, b) eingehend untersucht. Danach blockiert extrazellulär zugegebenes TEA gleichermaßen den Einwärtsgleichrichter wie den verzögerten Gleichrichter. Nach STANFIELD (1970 b) wird die halbmaximale Blockierung des Einwärtsgleichrichters bei einer TEA-Konzentration von 20 mM erreicht, die des verzögerten Gleichrichters bei 8 mM (STANFIELD, 1970 a). Die Versuche von STANFIELD (1970 a, b) sprechen für eine TEA-Bindungsstelle an der extrazellulären Membranseite. Die in dieser Arbeit vorgestellten Injektionsexperimente (s. Kap. 3.1.6.) zeigen jedoch, daß TEA auch nach intrazellulärer Zugabe den verzögerten Gleichrichter wirkungsvoll zu blockieren vermag. AUDIBERT-BENOIT (1972, 1973) sowie VOLLE, GLISSON und HENDERSON (1972) nehmen im Gegensatz zu STANFIELD (1970 a) an, daß TEA-Ionen die Muskelmembran passieren und auch intrazellulär wirken können.

Neben TEA werden in der Elektrophysiologie zunehmend Aminopyridine zur Blockierung der K^+-Leitfähigkeit verwendet. Eine der ersten Untersuchungen ergab, daß 4-Aminopyridin (4-AP) am Riesenaxon der Schabe Periplaneta americana die Repolarisationsphase des Aktionspotentials verlängert und im voltage-clamp Experiment spezifisch die verzögerten Kalium-Auswärtsströme blockiert. Dabei wurde die Na^+-Leitfähigkeit nicht beeinflußt. 4-AP war am gleichen Präparat 2000 mal wirksamer als TEA (PELHATE & PICHON, 1974). Inzwischen liegen auch Untersuchungen vor zur Wirkung von Aminopyridinen an myelinisierten Nervenfasern des Frosches (ULBRICHT & WAGNER, 1976), am Riesenaxon des Tintenfisches (YEH, OXFORD, WU & NARAHASHI, 1976 a, b; MEVES & PICHON, 1977; KIRSCH & NARAHASHI, 1978) und an Schneckenneuronen (KLEE, 1978). An Purkinjefäden des Schafherzens blockiert 4-AP den frühen K^+-Ausstrom (KENYON & GIBBONS, 1979).
Auch an der Frosch-Skelettmuskelfaser führt 4-Aminopyridin zu einer deutlichen Verlängerung der Repolarisationsphase des Aktionspotentials (KHAN & EDMAN, 1979; HORN et al., 1979). Erste Ergebnisse zur Wirksamkeit von 4-AP auf die Kaliumleitfähigkeit der Frosch-Skelettmuskelfaser wurden von GILLESPIE und HUTTER (1975), GILLESPIE (1977) und MOLGO (1978) erarbeitet. Einige Versuchsergebnisse der genannten Autoren werden an anderer Stelle dieser Arbeit ausführlich diskutiert (s. Kap. 4.1.).

Neben der blockierenden Wirkung auf die Kaliumleitfähigkeit ist Aminopyridinen und quaternären Ammoniumverbindungen eine Beeinflussung der neuro-muskulären Übertragung gemeinsam. Beide Substanzen bewirken eine Verstärkung der Transmitterfreisetzung. Für TEA wurde dies von KATZ und MILEDI (1969) gezeigt. 4-AP und andere Aminopyridine sind inzwischen an vielen Präparaten untersucht worden. Stellvertretend seien hier die Arbeiten von LUNDH und THESLEFF (1977), HARVEY und MARSHALL (1977), ILLES und THESLEFF (1978) sowie HORN, LAMBERT und MARSHALL (1979) genannt. Durch die Erhöhung der Transmitterfreisetzung können Aminopyridine einer Blockierung der synaptischen Übertragung durch Curare

und Botulinus-Toxin entgegenwirken (LUNDH, LEANDER & THESLEFF, 1977) und sind in dieser Eigenschaft auch klinisch untersucht worden (STOYANOV, VULCHEN, SHURBOVA & MARINOVA, 1976). Es wird diskutiert, daß möglicherweise sowohl TEA als auch Aminopyridine den Einstrom von Kalziumionen in die Nervenendigung während eines Aktionspotentials verstärken und dadurch eine Erhöhung der Transmitterfreisetzung bewirken (LUNDH & THESLEFF, 1977; KATZ & MILEDI, 1969).

In den vorliegenden Experimenten wurde die Wirkung von TEA und 4-AP auf den verzögerten Gleichrichter untersucht. Durch Injektion konnte direkt gezeigt werden, daß beide Substanzen auch auf der intrazellulären Seite der Membran wirksam sind. Die Ergebnisse ermöglichen den Vergleich mit der Wirkung von TEA und 4-AP auf Kanäle des verzögerten Gleichrichters anderer Präparate (Riesenaxon des Tintenfisches, Ranvier'scher Schnürring).

1.2. Die hohe Kaliumleitfähigkeit stoffwechselvergifteter und erschöpfter Skelettmuskelfasern

Das normale Kalium-Leitfähigkeitssystem zeigt grundlegende Veränderungen in Skelettmuskelfasern, deren Energiereserven und deren Kontraktionsfähigkeit erschöpft wurden. Die Experimente von LÜTTGAU (1965) und GRABOWSKI, LOBSIGER und LÜTTGAU (1972) führten zu der Vermutung, daß nach der Vergiftung des Stoffwechsels durch Cyanid und Monojodazetat und der anschließenden Erschöpfung der Kontraktilität die Membranleitfähigkeit für Kaliumionen erhöht ist. Quantitative Bestimmungen der Membrankonstanten und der Kalium-Leitfähigkeitsverhältnisse wurden von FINK (1975 a, b), FINK und LÜTTGAU (1976) und FINK (1978) durchgeführt. Sie zeigten, daß die Kaliumruheleitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern hundertfach erhöht ist (s. auch Kap.4.2.1.). HASE (1978) konnte durch Vergiftung des Stoffwechsels mit 2,4-Dinitrofluorbenzol die Ergebnisse von FINK und LÜTTGAU (1976) bestätigen und damit zeigen, daß die K^+-Leitfähigkeitserhöhung nicht die

Folge einer unspezifischen Giftwirkung ist. Biochemische Untersuchungen ergaben eine drastische Reduktion der Energievorräte in erschöpften Muskelfasern. Creatinphosphat konnte nicht mehr nachgewiesen werden, und die intrazelluläre ATP-Konzentration war um 80 % erniedrigt (HASE, 1978). Weitere Aufschlüsse über die veränderte K^+-Leitfähigkeit vermittelten voltage-clamp Experimente (FINK, GROCKI, LÜTTGAU & WETTWER, 1977; FINK & WETTWER, 1978). Sie zeigten, daß auswärtsgerichtete Membranströme erschöpfter Muskelfasern über einen weiten Potentialbereich eine lineare Abhängigkeit vom Membranpotential aufwiesen und permanent aktiviert waren. Normale Fasern haben dagegen eine nicht lineare Strom-Spannungskennlinie aufgrund der Aktivierung des verzögerten Gleichrichters oberhalb eines charakteristischen Schwellenpotentials (s. Kap. 1.1.) In Abb. 1 sind Membranströme und Strom-Spannungs-Kennlinien normaler und erschöpfter Muskelfasern gegenübergestellt. Tabelle I gestattet den Vergleich der wichtigsten Membraneigenschaften.
Die erhöhte Kaliumleitfähigkeit im erschöpften Zustand beruht möglicherweise auf der Beteiligung vor allem des verzögerten Gleichrichters (FINK, 1978). Da sie weder eine verzögerte Aktivierungsphase noch eine Inaktivierung zeigt (vgl. Abb. 1), entwickelten FINK und WETTWER (1978) die Vorstellung, daß die Kanäle des verzögerten Gleichrichters im erschöpften Zustand unabhängig vom Membranpotential permanent geöffnet sind.
An einigen biologischen Präparaten sind Kaliumleitfähigkeitskomponenten beschrieben worden, die durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration gesteuert werden, so z. B. an Schneckenneuronen (MEECH, 1978) oder an Purkinjefasern des Herzens (ISENBERG, 1977, a-d). Auch für den erschöpften Skelettmuskel erschien das Modell der Ca^{2+}-induzierten K^+-Leitfähigkeitserhöhung attraktiv. Es lag nahe anzunehmen, daß der Energiemangel aufgrund einer Störung der aktiven Kalziumaufnahme durch das sarkoplasmatische Retikulum (SR) zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt (FINK & LÜTTGAU, 1976; FINK, 1978). Demzufolge sollten EGTA- und ATP-Injektionen durch Senkung des Ca^{2+}-

Spiegels bzw. Reaktivierung der Kalziumpumpe des SR eine Erniedrigung der hohen Kaliumleitfähigkeit erschöpfter Muskelfasern bewirken. Entsprechende Versuche brachten jedoch keine eindeutigen Erfolge. Es wurden nur geringe Erniedrigungen der hohen Membranleitfähigkeit beobachtet (FINK & WETTWER, unveröffentlichte Ergebnisse). Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, daß dieser Mißerfolg auf dem durch Cyanid und Monojodazetatvergiftung hervorgerufenen irreversiblen Erschöpfungsprozeß selbst beruhte. Deshalb bestand eine wichtige Aufgabe in der vorliegenden Untersuchung zunächst darin, die prinzipielle Reversibilität von Stoffwechselvergiftung und Kontraktionskrafterschöpfung und der damit einhergehenden Membranleitfähigkeitserhöhung zu zeigen. Nachdem ein reversibler, intermediärer Erschöpfungszustand gefunden war (s.Kap.3.2.1.), wurde erneut der Versuch unternommen, die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu verändern, um auf diese Weise die Hypothese einer Ca^{2+}-induzierten K^{+}-Leitfähigkeitskomponente zu überprüfen. Durch diese Experimente wurde die Vorstellung unterstützt, daß an der erschöpften Skelettmuskelfaser eine Ca^{2+}-induzierte K^{+}-Leitfähigkeitskomponente existiert. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration ist jedoch sicher nicht die alleinige Ursache für die Membranleitfähigkeitserhöhung; denn auch in normalen Fasern kommt es während der Kontraktionsaktivierung zu einer enormen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, ohne daß sich dadurch die Kaliumleitfähigkeit der Membran wesentlich ändert. Es erscheint deshalb sehr wahrscheinlich, daß die veränderte Stoffwechselsituation einen wesentlichen Einfluß auf die Kaliumleitfähigkeit hat.

Mit zunehmender Deutlichkeit stellt sich somit die Kaliumleitfähigkeit als ein variables System dar, dessen Regulation eng mit der Stoffwechselsituation der Zelle verknüpft ist. Mit dieser Erkenntnis wird zugleich der Weg für zukünftige Untersuchungen abgesteckt.

Einige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht: FINK, GROCKI, LÜTTGAU & WETTWER (1977); FINK & WETTWER (1978); WETTWER, HASE & LÜTTGAU (1980, 1981).

Tabelle I

Eigenschaften normaler und erschöpfter Skelettmuskelfasern
- Membrankonstanten, Ionenkonzentrationen, Stoffwechselenergie -

Normale Faser		T [°C]	Ref.	Erschöpfte Faser	T [°C]	Ref.
R.P. [mV]	-93	20	6	Hyperpolarisation d. Membranpotentials		
R_o [kΩ]	320*	20	8	A: 56 31 B: 73 46	0-1 23 0-3 20	4 5
G_M [µS/cm^2]	350*	20	8	A: 17200	23	4
G_K [µS/cm^2]	132* a	20	8 10	A: 14300 b	23	2 1
G_{Cl} [µS/cm^2]	198*	20	8	A: 2900	23	4
$G_K : G_{Cl}$	2 : 3		7/8	A: 5 : 1	23	4
C_M [µF/cm^2]	6.1*	20	8/9	A: 8.4	0	2
$P_{Na} : P_K$	1 : 100		7	A: 1 : 110		3
λ [cm]	1.9*	20	8	A: 0.37 0.31 B: 0.55	0-1 23 1-3	4 5
Na_i [mM/lFW]	24.1	21.5-23	4	A: 27.9	21.5-23	3
K_i [mM/lFW]	137.8	21.5-23	4	A: 116.0	21.5-23	3
ATP [mM/kgFG]	2.69		5	A: B: 0.48	0-1	5
CP [mM/kgFG]	12.4 20.0		5 11	A: 0.0 B: 14.7	0-1	5

* Angaben für Faserdurchmesser von 80 µm; CP: Creatinphosphat
a: 85 % blockierbar durch 115 mM TEA.
b: 95 % blockierbar durch 115 mM TEA.
A: Vergiftung mit Monojodazetat (1 mM) und Cyanid (2 mM)
B: Vergiftung mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (0.18-0.4 mM)

1 FINK (1978)
2 FINK, GROCKI & LÜTTGAU (1980a)
3 FINK, GROCKI & LÜTTGAU (1980b)
4 FINK & LÜTTGAU (1976)
5 HASE (1978)
6 HIRONAKA & MORIMOTO (1979)
7 HODGKIN & HOROWICZ (1959)
8 HODGKIN & NAKAJIMA (1972a)
9 HODGKIN & NAKAJIMA (1972b)
10 STANFILED (1970b)
11 WILKIE (1968)

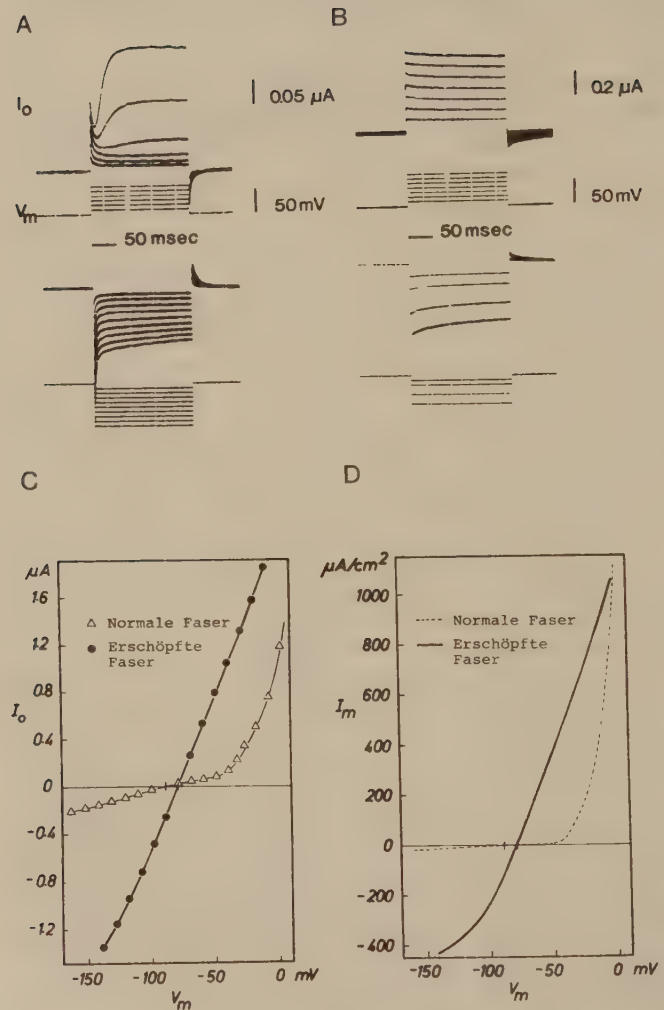

A
B
I_o
0.05 µA
0.2 µA
V_m
50 mV
50 mV
50 msec
50 msec
C
D
µA
1.6
1.2
0.8
0.4
0
-0.4
-0.8
-1.2
I_o
△ Normale Faser
● Erschöpfte Faser
-150
-100
-50
0 mV
V_m
µA/cm²
1000
800
600
400
200
0
-200
-400
I_m
Normale Faser
Erschöpfte Faser
-150
-100
-50
0 mV
V_m

Abb. 1

Abb. 1

Membranströme und Strom-Spannungskennlinien normaler und erschöpfter Skelettmuskelfasern

Voltage-clamp Experimente mit zwei Mikroelektroden

A: Normale Faser. Membranpotential V_M [mV] und Gesamt-Membranstrom I_o [µA] in depolarisierender und hyperpolarisierender Richtung. Hypertonische Ringerlösung (Lsg. B; TTX: 10^{-7} M. Ruhepotential (R.P.): -85 mV; Haltepotential (H.P.): -85 mV; T: 2.5° C.

B: Erschöpfte Faser. Membranpotential- und Gesamtstromregistrierung wie in A. Ringerlösung plus 2 mM Cyanid und 1 mM Monojodazetat. R.P.: -79 mV; H.P.: -80 mV; T: 1.4° C.

C: "Steady-state" Strom-Spannungskennlinie. Strommessung nach 150 msec. Abszisse: Membranpotential V_M [mV]; Ordinate: Gesamt-Membranstrom I_o [µA]. △ : Normale Faser; ● : Erschöpfte Faser.

D: Strom-Spannungskennlinien wie in C. Abszisse: V_M[mV]; Ordinate: Membranstromdichte I_M [µA/cm^2]. Die Gesamt-Membranströme aus C wurden mit Hilfe des Cole-Theorems in Membranstromdichten I_M umgerechnet (COLE, 1961):

$$I_M = \frac{R_i}{\pi^2 \cdot D^3} \cdot I_o \frac{dI_o}{dV_M} \cdot$$

R_i (Widerstand des Sarkoplasmas) wurde als konstant vorausgesetzt.
D (Faserdurchmesser) wurde aus Kabelkonstanten berechnet.
Normale Faser: R.P.: -89 mV; H.P.: -90 mV; R_i: 400 Ω·cm (der Innenwiderstand erhöht sich bei Verwendung hypertonischer Ringerlösung, HODGKIN & NAKAJIMA, 1972 a).
Erschöpfte Faser: R.P.: -79 mV; H.P.: -79 mV; R_i: 300 Ω·cm; D: 117.8 µm; T: 2.5° C. (FINK & WETTWER, 1978).

2. Methodik

2.1. Präparate

Als Versuchsobjekt diente stets der M.sartorius des Grasfrosches (Rana temporaria). Die Versuchstiere wurden mehrere Wochen bei ca. 4^{o} C ohne Fütterung im Kühlraum gehalten. Die präparierten Sartoriusmuskeln wurden entweder sofort verwendet oder aber spätestens nach einer Aufbewahrungszeit von 2 - 6 Stunden in Ringerlösung (Lsg. A, Kap. 2.2.) im Kühlschrank bei ca. 4^{o} C. Einige Experimente (Kontraktionskraftmessungen, Kap. 3.1.2.) wurden an Einzelfasern oder kleinen Bündeln von Einzelfasern (3-4 Fasern) des M. semitendinosus durchgeführt. Die Technik der Einzelfaserpräparation ist bei GOMOLLA (1980) ausführlich beschrieben (s. auch LÜTTGAU, 1965).

2.2. Lösungen

Es wurden die folgenden Versuchslösungen verwendet:

Lösung A: Standard-Ringerlösung (ADRIAN, 1956)

K^{+}: 2.5; Na^{+}: 120.15; Cl^{-}: 119.3; Ca^{2+}: 1.8; $H_2PO_4^{-}$: 0.85; HPO_4^{2-}: 2.15; pH: 7.2; Angaben in mM.

Lösung B: Hypertonische Ringerlösung (zur Kontraktionsunterdrückung; HOWARTH, 1958; HODGKIN-HOROWICZ, 1957)

Lsg. A plus 350 mM Saccharose. Saccharose wurde stets kurz vor Beginn der Experimente zu Lösung A addiert. Die Tonizität von Lsg. B ist etwa 2.4-fach höher als die von Lösung A.

Lösung C: Aminopyridin-Ringer

Lsg. B plus Aminopyridine (2-, 3- und 4-Aminopyridin)

Aminopyridine wurden als Einwaage der Lsg. B addiert, der pH-Wert mit HCl auf 7.2 eingestellt.

Lösung D: Chloridfreie Ringerlösung mit hoher Kaliumkonzentration (nach ADRIAN & FREYGANG, 1962 b)

K^+: 100; Na^+: 56.5; Ca^{2+}: 8.4; SO_4^{2-}: 85.4; HPO_4^{2-}: 1.04; $H_2PO_4^-$: 0.42;pH: 7.2; Angaben in mM.

Lösung E: Chloridfreie Aminopyridin-Ringerlösung mit hoher Kaliumkonzentration

Lsg. D plus Aminopyridine (1 und 5 mM). 4-Aminopyridin wurde Lsg. D als Einwaage zugegeben. Der pH-Wert (7.2) wurde mit H_2SO_4 eingestellt.

Lösung F: Cyanid-Ringer (Vergiftungsringer)

Lsg. A plus 4 mM NaCN.
NaCN wurde einer Stammlösung entnommen. Die Stammlösung enthielt:
20 mM NaCN (Merck); 115 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 1.8 mM $CaCl_2$; 3 mM Tris-Cl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanchlorid).

Lösung G: Cyanid-Ringer plus Coffein

Lsg. F plus 1.5 mM Coffein. Coffein wurde zu Lsg. F aus einer 50 mM Stammlösung addiert.

Lösung H: 4-AP Injektionslösung

520 mM 4-Aminopyridin in A.bidest., pH 7.2; eingestellt mit HCl.

Lösung J: 4-AP Injektionslösung

52 mM 4-Aminopyridin in 3M KCl-Lösung, pH 7.2; eingestellt mit HCl.

Lösung K: 4-AP Injektionslösung

5.2 mM 4-Aminopyridin in 3M KCl-Lösung, pH 7.2; eingestellt mit HCl.

Lösung L: TEA-Injektionslösung

800 mM Tetraäthylammoniumchlorid-Lösung in A. bidest, pH 1.3;

Lösung M: EGTA-Injektionslösung

Die EGTA-Injektionslösung enthielt 500 mM H_2EGTA^{2-} (Ethylenglykol-bis (2amino-ethyläther) N,N'-tetraessigsäure; $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$; MG 380.4) und 500 mM TES (Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethan-sulfonsäure; $C_6H_{15}NO_6S$; MG: 229.2; $pK_{a(20)}$, 7.5). Die Lösung wurde mit KOH (1167 mM) auf pH 7.2 eingestellt.

Lösung N: Ca-EGTA Injektionslösung

Für die Injektion von Ca-EGTA wurde ein EGTA/Ca-EGTA Puffergemisch hergestellt, das auf eine freie Ca^{2+}-Konzentration von 10^{-5} M eingestellt wurde. Die Ca-EGTA-Konzentration betrug 500 mM. Das Verhältnis von Ca-EGTA : EGTA = 50 : 1. Die Injektionslösung enthielt außerdem 500 mM TES und wurde mit KOH (1167 mM) auf pH 7.2 eingestellt.

Eine ausführliche Beschreibung der Herstellung von Lösungen mit definiertem niedrigen Ca^{2+}-Gehalt findet sich bei SPIECKER (1976, 1980).

2.3. Methodik der Stoffwechselvergiftung und Erschöpfung

Methode 1 (M1):

Vollständige Erschöpfung - irreversibler Zustand (Z3).
Die vollständige Erschöpfung der Muskeln wurde erzielt durch:

a) 1-stündige Inkubation in Ringerlösung plus Cyanid (2 mM) und Monojodazetat (1 mM) zur Blockierung von Glykolyse und Atmungskette.

b) Die verbleibenden Energiereserven wurden durch wiederholte Auslösung von Kontraktionen durch extrazelluläre Reizung (Frequenz: $1 s^{-1}$) herabgesetzt. Die Kontraktionen wurden bei 40-100-facher Vergrößerung kontrolliert. Nach 300-800 Reizen (T: 0-1° C) konnten in der Regel keine Kontraktionen mehr beobachtet werden. Dieses Stadium wurde von FINK (1978) als Zustand der vollständigen Erschöpfung definiert (Z3). (S. auch FINK, 1975 a, b; FINK & LÜTTGAU, 1976).

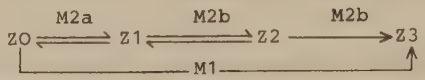
Methode 2 (M2):

Teilerschöpfung - reversibler, intermediärer Zustand (Z1, Z2)

a) Die Muskeln wurden 40 min in Ringerlösung plus 4 mM Cyanid äquilibriert (Lsg. F, Kap. 2.2.). Danach wurden durch extrazelluläre niederfrequente und hochfrequente Reizung (Frequenzen: 1-4 s^{-1} und 10-20 s^{-1}) Einzelkontraktionen bzw. Tetani ausgelöst, solange bis nach jeweils fünfminütiger Reizpause keine oder nur eine sehr schwache Erholung der Kontraktilität festzustellen war.

b) Die Reizung wurde intrazellulär durch kurze depolarisierende voltage-clamp Pulse (Dauer: 100 ms) fortgeführt, die eine Aktivierung des verzögerten Gleichrichters bewirkten. Auf diese Weise konnte der Übergang in einen Zustand permanent aktivierter hoher Membranleitfähigkeit kontinuierlich verfolgt werden.

Das folgende Schema soll den Zusammenhang der beschriebenen Erschöpfungsmethoden und der durch sie ausgelösten Membranleitfähigkeitszustände verdeutlichen (s. auch Kap. 3.2.1.):



Z0: Normaler Zustand (normale Aktivierbarkeit des verzögerten Gleichrichters; s. Abb. 1A).

Z1: Reversibler intermediärer Zustand (Membranleitfähigkeit erhöht, Aktivierung des verzögerten Gleichrichters noch möglich; s. Abb. 19, Spur 1).

Z2: Reversibler Erschöpfungszustand (permanent aktivierte hohe Membranleitfähigkeit; s. Abb. 19, Spur 2-5).

Z3: Irreversibler Erschöpfungszustand (s. Abb. 1B).

2.4.. Versuchsaufbau

Während eines Experimentes war das Ganz-Muskel Präparat mit der bindegewebsarmen Innenfläche nach oben, auf ca. 130 % seiner Ruhelänge gestreckt in der Versuchskammer festgesteckt oder aber nach der Methode von STEFANI und SCHMIDT (1972) zur Verminderung von Kontraktionsartefakten auf ein Kunststoffröhrchen (Ø 3 mm) aufgewickelt. Die zur Temperierung mit Kühlmittel (Glycerin-Wassergemisch) umspülte doppelwandige Kammer war aus Plexiglas gefertigt und mit einem Silikon-Harz (Sylgard 184, Dow Corning) ausgeformt, um Toträume beim Lösungswechsel zu vermeiden und das Präparat feststecken zu können. Der Lösungszulauf erfolgte über einen Dreiwegehahn. Die Badlösung wurde oberflächlich abgesaugt und gleichzeitig durch Überlauf mit einem Abfluß am Boden der Versuchskammer entfernt. Die Lösungsdurchflußgeschwindigkeit betrug bei Lösungswechsel etwa 40-45 ml/min, die Lösungsmenge in der Kammer unter experimentellen Bedingungen ca. 5-6 ml. Bis zum vollständigen Lösungsaustausch vergingen ca. 30 bis 45 sec (geprüft mit farbiger Kalium-Permanganatlösung, ohne Präparat). Ein Lösungswechsel wurde jeweils mit ca. 40-60 ml Lösung durchgeführt und dauerte maximal 2 min. Die Badlösung wurde nicht in ständigem Durchlauf erneuert. Die Badtemperatur wurde mit einem Thermistor über eine Brückenschaltung kontrolliert und konnte am Ort der Messung auf $\pm$ 0,5° C konstant gehalten werden.

Membranpotentiale wurden intrazellulär mit konventionellen Glas-Mikroelektroden gemessen. Sie wurden mit 3 M KCl gefüllt und hatten Widerstände zwischen 8 und 15 MΩ bei Tip-Potentialen unter 10 mV. Glasmikroelektroden zur Stromzuführung waren mit 2 M K^+-Citrat gefüllt und hatten Widerstände zwischen 6 und 10 MΩ. Injektionselektroden wurden in Aqua bidest gefüllt. Einige Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Wasser durch die jeweilige Injektionslösung ausgetauscht (s. auch Injektionstechnik).

Die Mikroelektroden wurden über elektronisch ferngesteuerte durch Elektromotoren angetriebene Mikromanipulatoren in die Muskelfaser eingestochen. Die Kontrolle des Einstichs erfolgte visuell über Spannungsmeßinstrumente, die das Membranpotential anzeigten,oder mit Hilfe eines Binokulars bei 40 - 100-facher Vergrößerung.

Voltage-clamp Technik

Die verwendete voltage-clamp Apparatur entsprach in den wesentlichen Teilen der zuvor ausführlich beschriebenen Anlage (WETTWER, 1975; FINK, 1978). Der prinzipielle Aufbau entspricht mit Abänderungen der Punkt-voltage-clamp Anlage nach COSTANTIN (1968). Abbildung 2 zeigt das Blockschaltbild der Apparatur. Einzelheiten können der Bildunterschrift zu Abb. 2 entnommen werden. Eine zusammenfassende Darstellung der für voltage-clamp Messungen wichtigen theoretischen Grundlagen der linearen Kabeltheorie findet sich bei FINK (1978).

Injektionstechnik

Die Substanzen, deren intrazelluläre Wirkung untersucht werden sollte, wurden durch iontophoretische Injektion in die Zelle gebracht. Die Injektionslösungen (Kap. 2.2.) wurden mit Injektionsspritzen in Glasmikroelektroden eingefüllt, die vorher in Aqua bidest gekocht und gefüllt worden waren. Durch die Injektionslösung wurde dabei das Wasser verdrängt. Derart gefüllte Elektroden blieben zur Äquilibrierung des Spitzenvolumens einige Stunden vor Gebrauch in der jeweiligen Injektionslösung eingetaucht.
Der Injektionsstrom wurde von einem Reizgerät mit nachgeschalteter Isolationseinheit geliefert (s. Abb. 2). Das Injektionspulsprogramm konnte durch einen Zeitgeber (Digitimer) gesteuert werden. Da die langandauernden Injektionsströme je nach

Größe zu einer Veränderung des Membranpotentials führten (je nach zu injizierender Ionensorte in hyper-, oder depolarisierender Richtung), wurden die Muskelfasern auch während der Injektionen "geklemmt". Damit wurde gewährleistet, daß Membranpotentialabweichungen, bedingt durch den Injektionsstrom, stets durch den Kontrollverstärker der voltage-clamp Elektronik ausgeglichen wurden und somit das Haltepotential der Faser auch während der Injektionen konstant blieb. Aus diesem Grunde konnte jedoch der Injektionsstrom nicht über den Strom-Spannungswandler der voltage-clamp Apparatur registriert werden, sondern mußte durch die Messung des Spannungsabfalls über einem 10 KΩ-Meßwiderstand im "Erdleiter" des Injektionsstromkreises bestimmt werden. Der Spannungsabfall über dem Meßwiderstand wurde mit einem Differenzverstärker gemessen und 100-fach verstärkt auf den Eingang eines Schreibers gegeben. Die Schreiberprotokolle wurden zur Bestimmung der injizierten Ladungsmengen ausgewertet (s. auch Kap. 2.5.1.).

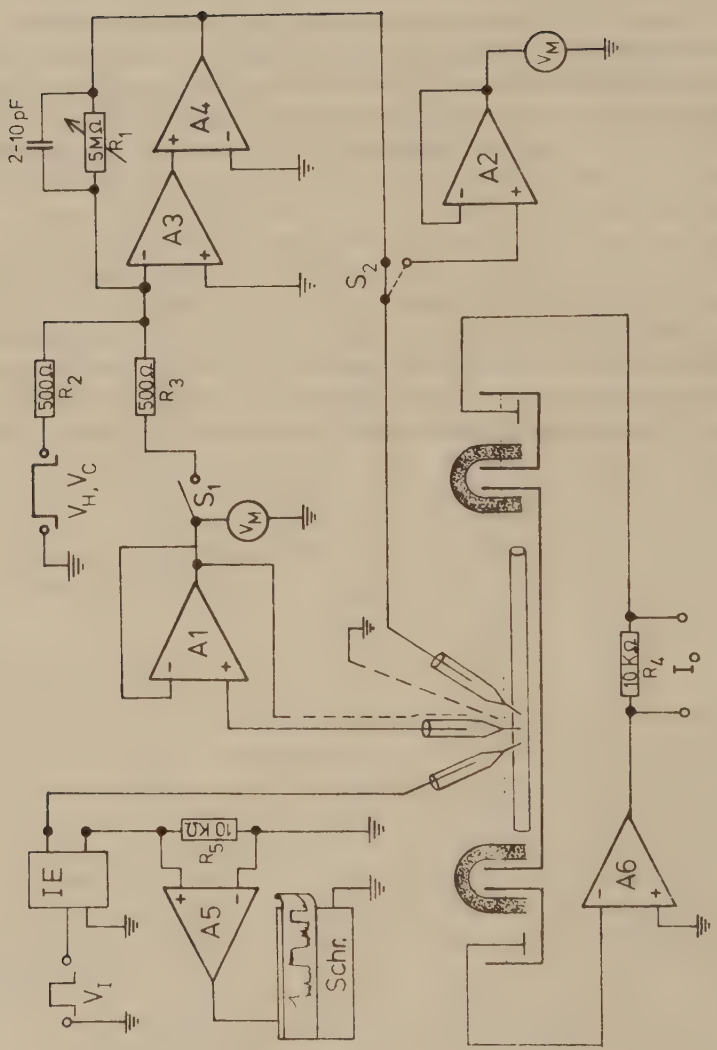

2-10 pF
5MΩ
R1
A4
A3
A2
VM
S2
500Ω
R2
500Ω
R3
VH, VC
S1
VM
A1
IE
VI
10 KΩ
R5
A5
Schr.
10 KΩ
R4
Io
A6

Abb. 2

Abb. 2

Block-Schaltbild der voltage-clamp Apparatur und der Einrichtung zur iontophoretischen Injektion

Voltage-clamp Apparatur:

1) Messung des Membranpotentials (V_M) mit Hilfe von A1 und A2 (Operationsverstärker, Philbrick 1029, als Spannungsfolger geschaltet, Verstärkungsfaktor 1). Bei A1 ist die Abschirmung des Elektrodenhalters zur Kapazitätsneutralisation mit dem Ausgang von A1 verbunden. A2 ermöglicht die Messung von V_M mit der Stromelektrode zur Überprüfung des Einstichs. Schalter S_2 stellt wahlweise die Verbindung zwischen Stromelektrode und dem Eingang von A2 oder dem Ausgang des Rückkopplungsverstärkers (A4) her.

2) Der Rückkopplungsverstärker setzt sich aus 2 Operationsverstärkern zusammen (A3, Philbrick 1025; A4, Analog Devices 171 K). A4 liefert hohe Ausgangsspannungen von max.±140 V. A3 und A4 sind zusammen als invertierender Verstärker geschaltet. Die max. Verstärkung beträgt 10^4; sie ergibt sich aus dem Verhältnis R_1/R_2 (bzw. R_3). Zur Vermeidung von Oszillationen liegt R_1 eine kleine Kapazität (2-10 pF) parallel. Durch Schließen von S_1 wird der Rückkopplungskreis geschlossen.

3) Virtual-ground clamp und Messung des Gesamt-Membranstromes I_o. A5 (Burr-Brown 1552/15 als Strom-Spannungswandler geschaltet) hält das Bad-Potential konstant auf Massepotential. I_o wird als Spannungsabfall über R_4 (10 kΩ) bestimmt. Die leitende Verbindung zwischen Eingang und Ausgang von A5 und dem Bad wird über Ag-AgCl-Elektroden und Agar-Agar-Brücken hergestellt. V_H, V_C: Spannungsquellen für Haltepotential (V_H) und Spannungssprung des voltage-clamp Schrittes (V_C).

Iontophoretische Injektion:

Der Injektionsstrom wird von einem Reizgerät (V_1) mit nachgeschalteter Isolationseinheit (IE) geliefert Die Messung des Injektionsstromes erfolgt in der Erdleitung des Injektionsstromkreises als Spannungsabfall über R_5 (10 kΩ). Der Spannungsabfall wird mit dem Differenzverstärker A5 (Grass P18) 100-fach verstärkt dem Eingang des Schreibers (Schr) (Schwarzer) zugeführt. Die Schreiberprotokolle wurden zur Bestimmung der injizierten Gesamtladungsmenge ausgewertet.

2.5. Annahmen und Berechnungen zur Abschätzung der Stoffmengen und Konzentrationsverteilung intrazellulär applizierter Substanzen

2.5.1. Berechnung der injizierten Stoffmengen an EGTA und Ca-EGTA

Die Abschätzung der injizierten Stoffmengen an EGTA und Ca-EGTA (im folgenden steht EGTA für EGTA und Ca-EGTA) erfolgte aus den Schreiberregistrierungen der Injektionsströme (s. auch Kap. 2.4.). Es wurde angenommen, daß die injizierte Ladungsmenge (Injektionsstrom x Injektionsdauer) der injizierten Stoffmenge direkt proportional ist. Die Injektionslösungen M und N (Kap. 2.2.) stellten eine Elektrolytmischung verschiedener ein- und zweiwertiger Ionen dar. Die Überführungszahlen eines solchen Gemisches lassen sich nicht theoretisch berechnen, sondern nur experimentell bestimmen (ROBINSON & STOKES, 1970). Darüberhinaus wurden für EGTA keine Angaben zu Überführungszahlen gefunden. Es konnte deshalb nur eine Abschätzung der injizierten Stoffmengen aufgrund der folgenden Annahmen durchgeführt werden:

1.) EGTA liegt im dissoziierten Zustand zu 100 % als 2-fach negativ geladenes Ion vor (berechnet werden 98 % bei pH 7.2).

2.) Die Beweglichkeit u aller Ionen der Injektionslösung ist gleich.
Aus dieser Annahme folgt, daß die transportierte Gesamtladungsmenge einer Injektion $Q_t = I_i \cdot T_i$ (Injektionsstrom I_i x Gesamtinjektionsdauer T_i) zu gleichen Teilen aus positiven und negativen Ladungsträgern besteht:

$$Q_t = Q_- + Q_+ \qquad (1)$$

und

$$Q_- = \frac{1}{2} Q_t \qquad (2)$$

In der Injektionslösung M und N lagen zwei negativ geladene Ionen vor: $EGTA^{2-}$ und TES^{-}. Für die von EGTA getragene Ladungsmenge gilt:

$$Q_{EGTA} = Q_{-} - Q_{TES} \qquad (3)$$

Für die durch den Pipettenquerschnitt (q) transportierte Ladungsmenge an EGTA (1) und TES (2) (im folgenden durch Index 1 und 2 bezeichnet) gilt:

$$Q_1 = I_1 \cdot T_i = z_1 \cdot e_o \cdot n_1 \cdot q \cdot u_1 \cdot T_i \qquad (4)$$

$$Q_2 = I_2 \cdot T_i = z_2 \cdot e_o \cdot n_2 \cdot q \cdot u_2 \cdot T_i \qquad (5)$$

z : Wertigkeit, e_o : Einheitsladung, n : Teilchenzahldichte. Aus Gleichung 1, 3 und 4 folgt unter der Annahme, daß $u_1 = u_2 = u$:

$$Q_{-} = (I_1 + I_2)T_i = u \cdot e_o \cdot q \cdot T_i (z_1 \cdot n_1 + z_2 \cdot n_2) \qquad (6)$$

Für das Verhältnis $\frac{Q_1}{Q_-}$ gilt dann nach Gl. 4 und 6

$$\frac{Q_1}{Q_-} = \frac{z_1 \cdot n_1}{(z_1 \cdot n_1 + z_2 \cdot n_2)} \qquad (7)$$

mit $n_i = c_i \cdot L \quad (i = 1,2)$

(c : Teilchenkonzentration, L : Loschmidt'sche Zahl)

gilt dann für Q_1 mit Hilfe von Gl. 2:

$$Q_1 = \frac{z_1 \cdot c_1}{(z_1 \cdot c_1 + z_2 \cdot c_2)} \cdot \frac{Q_t}{2} \qquad (8)$$

entsprechend gilt für Q_2 :

$$Q_2 = \frac{z_2 \cdot c_2}{(z_1 \cdot c_1 + z_2 \cdot c_2)} \cdot \frac{Q_t}{2} \qquad (9)$$

Da TES bei pH 7.2 nur zu 1/3 als negativ geladenes Ion vorliegt, betrug das Konzentrationsverhältnis der negativen Ladungsträger EGTA/TES : $c_1/c_2 = 3/1$

Für die injizierte Stoffmenge M_i [Mol] an EGTA und TES gilt dann:

$$M_{i[EGTA]} = \frac{z_1 \cdot c_1}{(z_1 \cdot c_1 + z_2 \cdot c_2)} \cdot \frac{Q_t}{2 \cdot F} \qquad (10)$$

F: Faraday-Konstante (96487 As . Mol^{-1})

bzw. $$M_{i[TES]} = \frac{z_2 \cdot c_2}{(z_1 \cdot c_1 + z_2 \cdot c_2)} \cdot \frac{Q_t}{2 \cdot F} \qquad (11)$$

Für die gegebenen Konzentrationen c_1 und c_2 in den Injektionslösungen M und N gilt:

$$M_{i[EGTA]} = 22.2 \cdot 10^{-7} \frac{Mol}{As} \cdot Q_t \qquad (12)$$

bzw. $$M_{i[TES]} = 7.4 \cdot 10^{-7} \frac{Mol}{As} \cdot Q_t \qquad (13)$$

2.5.1.1. Experimentelle Bestimmung der Transportzahl für Ca-EGTA (bzw. EGTA)

Um die in Kap. 2.5.1. gemachten Annahmen zu überprüfen, wurde der Versuch unternommen, eine Transportzahl für die Ca-EGTA Injektionen zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde Ca-EGTA in bekannte Volumina injiziert und nach der Injektion die Ca^{2+}-Konzentration der Test-Lösung mit einem Atomabsorptionsspektrometer bestimmt. Der direkte Vergleich zwischen den gemessenen Konzentrationen und den aufgrund der Annahmen in Kap. 2.5.1. berechneten sollte Aufschluß über die Anwendbarkeit der Annahmen geben und eine direkte Eichung der Injektionsströme ermöglichen. Die praktische Durchführung erwies sich jedoch als sehr schwierig, da die eingesetzten absoluten Ca^{2+}-Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze des Spektrometers lagen. Tabelle II zeigt das Ergebnis aus drei Testinjektionen. Die im Absorptionsspektrometer gemessenen Ca^{2+}-Konzentrationen lagen im Mittel um den Faktor 0.8 niedriger als die berechneten Ca^{2+}-Konzentrationen. Dies erscheint wahrscheinlich, da die Ionenbeweglichkeit des großen EGTA- bzw. Ca-EGTA-Moleküls kleiner sein dürfte als die des Kalium-Ions.

Tabelle II

	Berechnete Ca^{2+}-Konzentration [M]	gemessene Ca^{2+}-Konzentration [M]
1.	$1.55 \cdot 10^{-6}$	$1.8 \cdot 10^{-6}$
2.	$1.32 \cdot 10^{-6}$	$0.77 \cdot 10^{-6}$
3.	$1.57 \cdot 10^{-6}$	$0.93 \cdot 10^{-6}$

2.5.2. Konzentrationsverteilung der injizierten Stoffmengen an EGTA bzw. Ca-EGTA - Diffusionsmodell

Zur Abschätzung der Konzentrationsverteilung wurde das Diffusionsmodell einer punktförmigen Quelle in einem unendlichen Volumen gewählt. Die Konzentration zum Zeitpunkt t [s] nach Diffusionsbeginn im Abstand r [cm] von der Punktquelle läßt sich nach Gleichung (1) berechnen (CRANK, 1975):

$$C(r, t) = \frac{M}{8(\pi \cdot D \cdot t)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{r^2}{4Dt}} \qquad (1)$$

M [Mol] ist die diffundierende Stoffmenge. D $[\frac{cm^2}{s}]$ ist die Diffusionskonstante des diffundierenden Stoffes. Gleichung (1) beschreibt die Konzentrationsverteilung für den Fall, daß die gesamte injizierte Stoffmenge zum Zeitpunkt t = o injiziert wurde.

In den Injektionsexperimenten erfolgte jedoch die Zuführung näherungsweise kontinuierlich über einen Zeitraum von einigen Minuten, d. h. während noch injiziert wurde, diffundierte ein Teil der Substanz bereits von der Injektionsstelle weg. Dieser Sachverhalt wird in Gleichung (2) berücksichtigt, die C(r, t) bei der Annahme einer kontinuierlichen Quelle beschreibt (CRANK, 1975; CARSLAW & JAEGER, 1959):

$$C(r,t) = \frac{q}{4 \cdot \pi \cdot D \cdot t} \cdot \operatorname{erfc} \frac{r}{2 \cdot \sqrt{D \cdot t}} \qquad (2)$$

In Gleichung (2) ist q die konstante pro Zeiteinheit injizierte Stoffmenge [Mol/s].
Die erfc-Funktion ist folgendermaßen definiert:

$$\mathrm{erfc}(x) = 1 - \mathrm{erf}(x)$$

$$\mathrm{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \int_0^x e^{-t^2} dt$$

Error-Funktionen sind tabelliert (s. z.B. ABRAMOWITZ & STEGUN, 1972).

Gleichung (2) eignet sich jedoch nicht zur Beschreibung der Konzentrationsverteilung, wenn die Konzentration in der Entfernung r vom Injektionsort nach einer zusätzlichen Wartezeit T_w nach dem Ende der Injektionszeit T_i berechnet werden soll, z. B. um die Konzentration zum Zeitpunkt der Erholung von der Wirkung des injizierten Stoffes abzuschätzen.

Für diesen Fall wurde die Konzentrationsverteilung folgendermaßen berechnet: Die injizierte Gesamtstoffmenge M_i wurde in gleiche Teile $\frac{M_i}{n}$ unterteilt und der Gesamtinjektionszeitraum in n gleiche Abschnitte $\frac{T_i}{n}$. Es wurde angenommen, daß zu Beginn jedes neuen Zeitabschnitts $t_a = \frac{T_i}{n}$ die Menge $\frac{M_i}{n}$ injiziert wurde. Die Verteilung der Gesamt-Injektionsmenge M_i in der Faser nach Ablauf der Gesamt-Injektionszeit T_i und einer zusätzlichen Wartezeit T_w in der Entfernung r vom Ort der Injektion läßt sich dann unter Verwendung von Gleichung (1) wie folgt berechnen:

$$C(r, t) = \sum_{a=1}^{n} \frac{M_i}{n \cdot 8 [\pi \cdot D \cdot (at + T_w)]^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{r^2}{4D(at+T_w)}} \qquad (3)$$

Für $n \to \infty$ und $T_w = 0$ entsprachen die berechneten Konzentrationen der Berechnung nach der Gleichung (2).

Die Berechnung der Diffusionsprofile (Abb. 24, Kap. 3.2.2.3. und Abb. 25, Kap. 3.2.3.3.) erfolgte mit Hilfe eines Rechnerprogramms für einen Taschenrechner (Texas Instruments TI 59). Für $0 \geq r \geq 100$ µm wurde n = 400 gewählt. Der Fehler der nach Gleichung (3) berechneten Konzentration im Vergleich zur Berechnung nach Gleichung (2) betrug weniger als 1 % bei einer Konzentrationsangabe in µM. Für $r \geq 100$ µM konnte n bei gleicher Fehlergrenze kleiner gewählt werden.

M_i wurde wie in Kap. 2.6.1. dargestellt berechnet. Für D [cm^2/sec] wurde ein Wert von $4.6 \cdot 10^{-6}$ cm^2/sec angenommen (MOISESCU & THIELECZEK, 1978).
Die Berechnung der wirksamen intrazellulären EGTA bzw. Ca-EGTA Konzentration erfolgte für einen Abstand r = 50 µm vom Injektionsort, da der Abstand zwischen den eingestochenen Mikroelektroden in der Regel $\leq$ 50 µm betrug.

Das verwendete Diffusionsmodell kann nur als eine relativ grobe Annäherung betrachtet werden. Es ist anzunehmen, daß die im Abstand r = 50 µm bei einem angenommenen Faserradius von 50 µm nach längeren Zeiträumen berechneten Konzentrationen zu klein sind, da der reale Diffusionsraum begrenzt ist und deshalb Reflexionen stattfinden. Die Einbeziehung der realen Diffusionsgrenzen hätte jedoch einen hohen mathematischen Aufwand erfordert und erschien nicht sinnvoll, da die übrigen Annahmen zur Berechnung der intrazellulären Stoffkonzentration ebenfalls nur grobe Abschätzungen sein können. Es zeigte sich jedoch, daß das verwendete Modell zu einer besseren Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen führte, als ein eindimensionales Diffusionsmodell. Dieses lieferte zu hohe intrazelluläre Konzentrationen der injizierten Substanzen, die nicht mit den experimentellen Ergebnissen in Einklang gebracht werden konnten.

2.5.3. Änderung der freien intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration nach EGTA bzw. Ca-EGTA Injektionen

Zur Berechnung der freien intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (Ca') nach einer EGTA bzw. Ca-EGTA Injektion wurde angenommen, daß im intermediären Erschöpfungszustand (Z1) Ca' vor einer Injektion 10^{-7} M beträgt und das Sarkoplasma eine Ca^{2+}-Bindungskapazität B der Zellproteine (Myofilamente und Parvalbumine) von 0.2 mM besitzt (LÜTTGAU & MOISESCU, 1978) mit einer apparenten Bindungskonstanten dieser Bindungsplätze für Kalziumionen von K_{app} = $1 \cdot 10^6\ M^{-1}$ (BREMEL & WEBER, 1975).
Dann gilt für die Gesamt-Ca^{2+}-Konzentration (Ca_t) vor einer Injektion:

$$Ca_t = Ca' + \frac{Ca' \cdot K_{app}}{(1 + Ca' \cdot K_{app})} \cdot B \qquad (1)$$

Mit den angenommenen Werten ergibt sich für Ca_t ein Wert von $18.28 \cdot 10^{-6}$ M.
Durch Injektion von EGTA bzw. Ca-EGTA verändert sich das Verhältnis zwischen gebundenem und freiem Kalzium.
Nach einer EGTA-Injektion bleibt Ca_t^{2+} konstant.
Nach einer Ca-EGTA Injektion erhöht sich Ca_t um die injizierte Menge Ca-EGTA pro Volumeneinheit.
Für Ca_t nach einer EGTA oder Ca-EGTA Injektion gilt dann:

$$Ca_t = Ca' + \frac{Ca' \cdot K_{app}}{(1 + Ca' \cdot K_{app})} \cdot B + \frac{Ca' \cdot K_{appx}}{(1 + Ca' \cdot K_{appx})} \cdot x \qquad (2)$$

In Gleichung (2) steht x für die intrazelluläre EGTA bzw. Ca-EGTA Konzentration. Für K_{appx} wurde ein Wert von $5 \cdot 10^6\ M^{-1}$ angenommen (MOISESCU & THIELECZEK, 1979). Berechnet wurde jeweils die neue freie Ca^{2+}-Konzentration Ca' nach einer EGTA oder Ca-EGTA Injektion. Für die intrazellulären Konzentrationen an EGTA bzw. Ca-EGTA wurden die nach Kap. 2.6.2. im Abstand r = 50 µm vom Ort der Injektion berechneten Werte eingesetzt.

Änderung der intrazellulären H-Ionen Konzentration nach Injektion von EGTA bzw. Ca-EGTA

Bei der Bindung von Ca^{2+} an H_2EGTA werden Protonen frei:

$$H_2EGTA^{2-} + Ca^{2+} \rightleftharpoons CaEGTA^{2-} + 2\ H^+$$

Um einer pH-Verschiebung im Intrazellulärraum nach einer EGTA oder Ca-EGTA Injektion entgegenzuwirken, wurde den Injektionslösungen (Lsg. M u. N, Kap. 2.2.) TES als Puffersubstanz zugesetzt. Die injizierte Menge an TES wurde entsprechend Kap.2.5.1. aus der injizierten Gesamtladungsmenge berechnet. Mit Hilfe des Diffusionsmodells (Kap. 2.5.2.) wurde die intrazelluläre TES-Konzentration am Ort der Messung (im Abstand von 50 µm vom Ort der Injektion) abgeschätzt.
Eine ausschlaggebende Größe für die Abschätzung intrazellulärer pH-Änderungen nach EGTA(Ca-EGTA)/TES-Injektionen stellt die H-Ionen Pufferkapazität der Zelle dar. AICKIN und THOMAS (1977) bestimmten am M. soleus der Maus eine pH-Kapazität von ca. 50 mEquiv./pH-Einheit und Liter. An Schneckenneuronen wurden von THOMAS (1976) zwischen 10 und 30 mEquiv./pH-Einheit und Liter bestimmt.
Bei einer Pufferkapazität von nur 10 mEquiv./pH-Einheit und Liter waren die berechneten pH-Änderungen sowohl für EGTA-/TES-Injektionen als auch für Ca-EGTA/TES-Injektionen vernachlässigbar klein (< 0.1 pH-Einheit). Diesen Abschätzungen zufolge ist es nicht sehr wahrscheinlich, daß die beschriebenen Effekte von EGTA und Ca-EGTA (Kap. 3.2.2.2. und Kap. 3.2.3.2.) auf pH-Änderungen des intrazellulären Milieus beruhen.

2.5.4. Abschätzungen und Berechnungen der injizierten Stoffmengen an 4-AP und TEA und der intrazellulären Konzentration nach Injektion

Zur Berechnung der injizierten Stoffmengen an 4-AP und TEA wurde für TEA^+ eine Überführungszahl n_+ von 0.24 und für $4\text{-}AP^+$ eine Überführungszahl von 0.3 angenommen. Für TEAJ beträgt n_+ 0.237 (0.1 Mol/kg; T : 25 °C; LANDOLT-BÖRNSTEIN, 1960). Da die Ionenleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung λ_o von Chlorid- und Jodid-Ionen nicht sehr unterschiedlich sind (LANDOLT-BÖRNSTEIN, 1960), wurde angenommen, daß die Übertragungszahl für TEA^+-Ionen einer TEA-Chloridlösung mit der einer TEA-Jodidlösung übereinstimmt. Für 4-AP wurde eine etwas größere Übertragungszahl von 0.3 angenommen, da 4-AP ein geringeres Molekulargewicht als TEA hat, aber eine dem TEA-Molekül ähnliche Geometrie aufweist. Für die Injektionslösungen K und J, in denen ein Gemisch aus 4-AP und KCl vorlag, wurde angenommen, daß bei gleicher Konzentration an K^+ und $4\text{-}AP^+$-Ionen $4\text{-}AP^+$ nur das 0.6-fache der durch K^+ getragenen Ladungsmenge überträgt. Die Abschätzung der intrazellulären Konzentrationen an 4-AP bzw. TEA nach einer Injektion erfolgte nach dem in Kap. 2.5.2. beschriebenen Diffusionsmodell. Die Diffusionskoeffizienten D für 4-AP und TEA mußten allerdings abgeschätzt werden, da keine Werte verfügbar waren. Nach STEIN (1967) besteht für die Diffusion von Molekülen unterschiedlichen Molekulargewichts M in Wasser zwischen dem Diffusionskoeffizienten und dem Molekulargewicht für $M \leq 1000$ folgende Beziehung:

$$D\sqrt{M} = \text{const. (c)} \qquad (1)$$

Logarithmierung von Gl. 1 führt zu einer Geradengleichung:

$$\lg D = \frac{1}{2} \cdot \lg M + \lg c \qquad (2)$$

Mit der Auftragung lg D gegen lg M von 17 verschiedenen Molekülen mit bekanntem Diffusionskoeffizienten wurde Gl. 1 über-

prüft. Folgende Regressionsgeradengleichung wurde ermittelt:

$$\lg D = - 0.447 \cdot \lg M - 4.153 \qquad (3)$$

Der Korrelationskoeffizient betrug -0.91.

Nach Gl. 3 wurden für 4-AP und TEA folgende Diffusionskoeffizienten errechnet:

4-AP (MG: 94.12) : $D : 9.2 \cdot 10^{-6}$ cm^2 s^{-1}

TEA^+ (MG: 130.26) : $D : 8.0 \cdot 10^{-6}$ cm^2 s^{-1}

Mit Hilfe dieser Diffusionskoeffizienten wurden die intrazellulären Konzentrationen nach Gl. 2 Kap. 2.5.2. für einen Abstand r=50 µm vom Injektionsort berechnet (s. Tab. IV und V, Spalte D).

3. Ergebnisse

3.1. Die extra- und intrazelluläre Wirkung von 4-Aminopyridin und Tetraethylammonium auf die Kaliumleitfähigkeit, insbesondere die des verzögerten Gleichrichters normaler Skelettmuskelfasern.

3.1.1. Die Wirkung von extrazellulär zugegebenem 4-Aminopyridin auf die verzögerte Gleichrichtung

Es wurde zunächst untersucht, wie extrazellulär appliziertes 4-Aminopyridin (4-AP) die Strom-Spannungskennlinie verändert und welche Abhängigkeit zwischen Einwirkungsdauer und Blockierung der "steady-state" Membranströme besteht. Die Messung der "steady-state" Blockierung wurde jedoch durch die Tatsache erschwert, daß die verzögert aktivierte Kaliumleitfähigkeit der Skelettmuskelfaser anders als bei der Nervenfaser bei anhaltender Membrandepolarisation wieder inaktiviert (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970a; s. auch Kap. 1.1.). Außerdem führen wiederholte kurzzeitige Depolarisationen (Dauer: 150 - 200 ms) zu einer "akkumulierenden Inaktivierung" (ALMERS, 1976). Eine solche Summation der Inaktivierung kann auftreten, wenn die zeitlichen Abstände zwischen zwei Klemmpulsen kürzer als 30 s sind. Die Frequenz, bei der sich eine akkumulierende Inaktivierung einstellt, ist von Faser zu Faser jedoch sehr unterschiedlich.
Um die akkumulierende Inaktivierung bei der Registrierung der blockierenden Wirkung von 4-Aminopyridin auszuschließen, wurde der verzögerte Gleichrichter über einen Zeitraum von maximal 30 min im zeitlichen Abstand von 2 min aktiviert. Verringerten sich die Membranströme (im steady-state) während dieser Kontrollphase, wurde das Experiment abgebrochen, blieben sie konstant, wurde 4-AP zur Badlösung gegeben (Lsg. C, Kap. 2.2.) und die blockierende Wirkung durch Test-Klemmpulse mit dem gleichen zeitlichen Abstand beobachtet.
Durchführung und Ergebnis eines solchen Experimentes sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt. Zu Beginn und zu seinem

Ende, dem Zeitpunkt maximaler Blockierung des verzögerten Gleichrichters, wurde eine Strom-Spannungs-Kennlinie aufgenommen (Abb. 3, ● bzw. x). Abb. 4 zeigt die Abnahme der Membranströme bei aufeinanderfolgenden Aktivierungen des verzögerten Gleichrichters unter dem Einfluß von 1 mM 4-AP. Es wurde jeweils auf das gleiche Membranpotential (-29 mV) depolarisiert.
Der Vergleich der Strom-Spannungskennlinien vor und nach der Zugabe von 4-AP (Abb. 3) zeigt deutlich, daß hauptsächlich die auswärtsgerichteten Membranströme im Aktivierungsbereich des verzögerten Gleichrichters verringert sind. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ist die maximale Blockierung durch 1 mM 4-AP ca. 15 min nach der Zugabe von 4-AP zur Badlösung erreicht. In Tabelle III sind die Versuchsergebnisse von 7 Fasern zusammengefaßt.
In Abbildung 5 ist die maximale Blockierung der Auswärtsströme im "steady-state" gegen das Membranpotential aufgetragen. Der Kurve liegen die Daten des Experiments aus Abb. 3 zugrunde. Eine Blockierung wird nur bei Membranpotentialen positiver als die Schwelle für die Aktivierung des verzögerten Gleichrichters (bei ca. -50 mV) sichtbar. Die größte Steilheit der Kurve und damit die größte Blockierungszunahme zeigt sich bei Membranpotentialen, die 5-10 mV positiver als die Schwelle des verzögerten Gleichrichters liegen. Mit zunehmend positiveren Membranpotentialen nimmt die Steilheit der Kurve ab, die Blockierung erreicht einen Maximalwert.

In Tabelle III finden sich zwei Angaben zur maximalen Blockierung. Der jeweils höhere Wert (Spalte D) wurde auf die Kontrollströme nach Abzug einer aus der Ruheleitfähigkeit linear extrapolierten Stromkomponente bezogen. Die Werte für die Blockierung lagen zwischen 38 und 65 % ohne Abzug einer linearen Komponente und zwischen 79 und 90 % nach Abzug. Es war keine eindeutige Dosisabhängigkeit der maximalen Blockierung bei 4-AP Konzentrationen zwischen 1 und 5 mM zu erkennen. Dies läßt den Schluß zu, daß die maximal wirksame Konzentration unter 1 mM liegt.

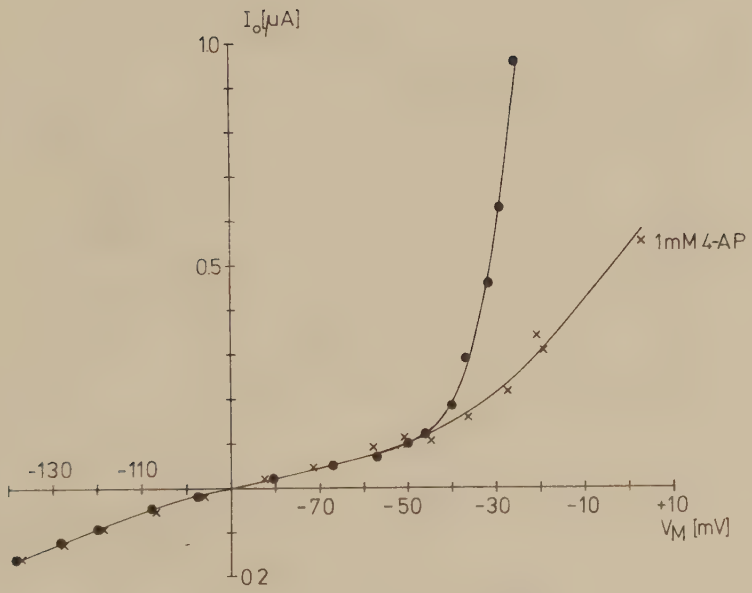


Abb. 3

"Steady-state" Strom-Spannungskennlinie einer Skelettmuskelfaser vor und nach der Zugabe von 4-Aminopyridin

Abszisse: Membranpotential V_M [mV]

Ordinate: Gesamt-Membranstrom I_o [µA]

(●): Strom-Spannungskennlinie vor der Zugabe von 4-AP (Kontrolle)

(×): Strom-Spannungskennlinie zum Zeitpunkt maximaler Blockierung durch 4-AP (1 mM)

(.....): lineare Stromkomponente (Leckleitfähigkeit, Chloridleitfähigkeit).

Die Messung der Membranströme erfolgte am Ende eines 150 ms dauernden Klemmpulses.

R.P.: -85 mV; H.P.: -90 mV; T: 4° C; TTX: 10^{-7} M; hypertonische Ringerlösung (Lsg. C, Kap. 2.2.)

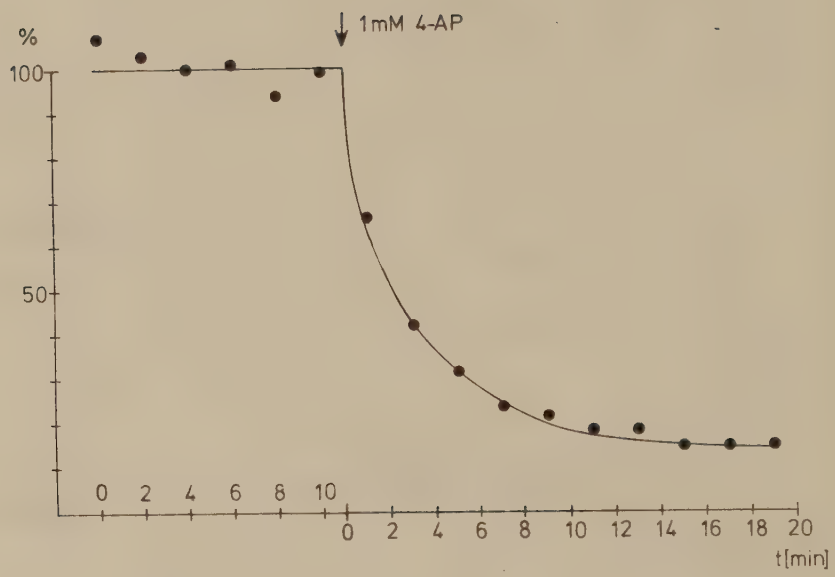


Abb. 4

Zeitlicher Verlauf der Blockierung der Membranströme durch 4-AP

Abszisse: Zeit t [min] vor und nach Lösungswechsel auf 4-AP Ringerlösung (Lsg. C, Kap. 2.2.).

Ordinate: Membranströme in % der Kontrolle nach Abzug der linearen Stromkomponente.

Die Kontrollströme entsprechen 100 %. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt des Lösungswechsels an. Kontrollströme und Blockierung wurden bei einem Membranpotential von -29 mV zum Ende eines 150 ms dauernden Klemmpulses gemessen.

R.P.: -85 mV; H.P.: -90 mV; T: 4° C; TTX: 10^{-7} M.

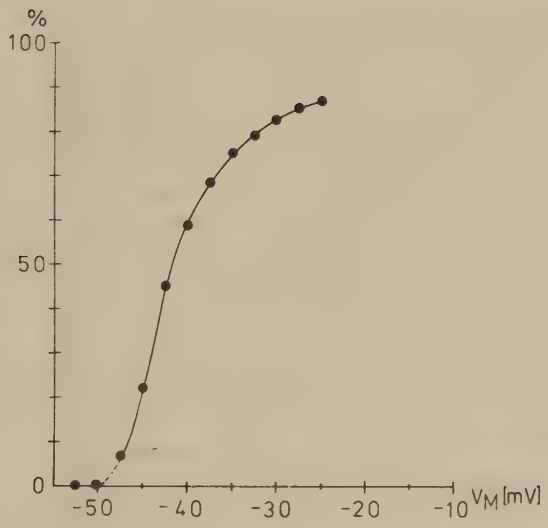


Abb. 5

Die Blockierung auswärts gerichteter Membranströme durch 4-AP in Abhängigkeit vom Membranpotential

Abszisse : Membranpotential V_M [mV]
Ordinate : Blockierung der Membranströme durch 4-AP (1 mM) angegeben in % der Kontrollströme ohne 4-AP nach Abzug der linearen Stromkomponente.

Der Darstellung liegen die experimentellen Daten aus Abb. 3 zugrunde.

Tabelle III

Die Wirkung von extrazellulär zugegebenem 4-AP auf den verzögerten Gleichrichter

	[4-AP] [mM]	A [mV]	B [min]	C [%]	D [%]	pH	T [°C]	R.P. [mV]	H.P. [mV]
1	1	-22	24	43.3	-	7.2	3-4	-78	-90
2	1	-12	14	65.0	79.0	7.2	3-4	-75	-90
3	1	-32	14	41.0	-	7.2	3-4	-90	-90
4	1	-29	15	62.0	84.0	7.2	2.5-3.5	-85	-90
5	1	-15	12	41.0	81.0	9.8	5-6	-80	-90
6	5	-26	10	52.0	90.0	7.2	2-3	-91	-95
7	5	-32	11	38.0	83.0	7.2	3-4	-89	-90

A) Angabe des Membranpotentials, bei welchem die Blockierung bestimmt wurde.
B) Zeit bis zur maximalen Blockierung.
C) Angabe der Blockierung auswärts gerichteter Membranströme in % der Kontrollströme.
D) Angabe der Blockierung auswärts gerichteter Membranströme nach Normierung durch Abzug der linearen Stromkomponente.

3.1.2. Wirkungseintritt und Reversibilität der 4-AP Wirkung - Kontraktionskraftmessungen an Einzelfaserpräparaten nach der Zugabe von 4-AP

Nach ca. 15-minütiger Einwirkungsdauer (nach dem Erreichen der maximalen Blockierung) konnte die Blockierung des verzögerten Gleichrichters durch 4-AP auch nach wiederholtem Auswaschen nicht aufgehoben werden. Dieser Befund widerspricht den Ergebnissen von MOLGO (1978), der an Einzelfaserstücken mit 4-AP eine reversible Blockierung des verzögerten Gleichrichters beschrieb. Die Vermutung lag nahe, die Unterschiede auf die abweichenden Versuchsbedingungen (ganzer Muskel - Einzelfaserstücke) zurückzuführen. Um die Frage der Reversibilität zu klären, wurde an Einzelfaserpräparaten des M. semitendinosus die Kontraktionskraft unter der Einwirkung von 4-AP gemessen.

KHAN und EDMAN (1979) erzielten mit 4-AP eine Erhöhung der Kontraktionskraft von Einzelfasern des M. semitendinosus. Die Autoren erklärten diesen Effekt mit der durch 4-AP hervorgerufenen Verlängerung der Aktionspotentiale, die als Folge einer reduzierten Leitfähigkeit des verzögerten Gleichrichters auftritt (PELHATE, HUE,PICHON, CHANELET, 1974; KHAN & EDMAN, 1979; HORN, LAMBERT & MARSHALL, 1979).
Demnach könnte die Kontraktionskrafterhöhung als indirektes Maß für die Blockierung des verzögerten Gleichrichters herangezogen werden.

KHAN und EDMAN (1979) beschrieben eine nur geringe Reversibilität der Zuckungsverstärkung bei Verwendung von 3 mM 4-AP. Allerdings begannen sie erst nach 45 min Einwirkungszeit mit dem Auswaschen von 4-AP. Die Kontraktionskrafterhöhung wurde erst 16 min nach 4-AP Zugabe gemessen. Sie war zu diesem Zeitpunkt bereits maximal und ging auch nach wiederholtem Auswaschen innerhalb von 225 min nur wenig zurück.

Um den genauen zeitlichen Verlauf der Kontraktionskrafterhöhung durch 4-AP zu untersuchen, wurden ähnliche Experimente an Einzelfasern und Bündeln von bis zu vier Fasern durchgeführt. Die

Präparate wurden alle 10 s mit einem Strompuls extrazellulär gereizt, und die Kontraktionskraft wurde fortlaufend registriert. Kurze Zeit nachdem die Zuckungen in 4-AP Ringer ein Maximum erreicht hatten, wurde 4-AP ausgewaschen und der Rückgang der Kontraktionskraft beobachtet. Die Versuche führten zu zwei wichtigen Ergebnissen (vgl. Abb. 6 u. 7):

1.) Die Zeit bis zur halbmaximalen Kontraktionskrafterhöhung war bei einer 4-AP Konzentration von 5 mM etwa 5 mal kürzer als bei einer 4-AP Konzentration von 1 mM (Abb. 6). Eine solche direkte Proportionalität zwischen 4-AP Konzentration und der Geschwindigkeit des Wirkungseintritts ist zu erwarten, wenn z. B. die Diffusion (evt. durch die Zellmembran) geschwindigkeitsbestimmend für den Zeitverlauf der 4-AP Wirkung ist.

2.) Der Effekt einer 5 mM 4-AP Ringerlösung, die ca. 7 min lang einwirkte, war vollständig reversibel. Die Halbwertszeit der Erholung betrug ca. 12 min (gemessen vom Zeitpunkt des Lösungswechsels auf 0 mM 4-AP) (Abb. 7).

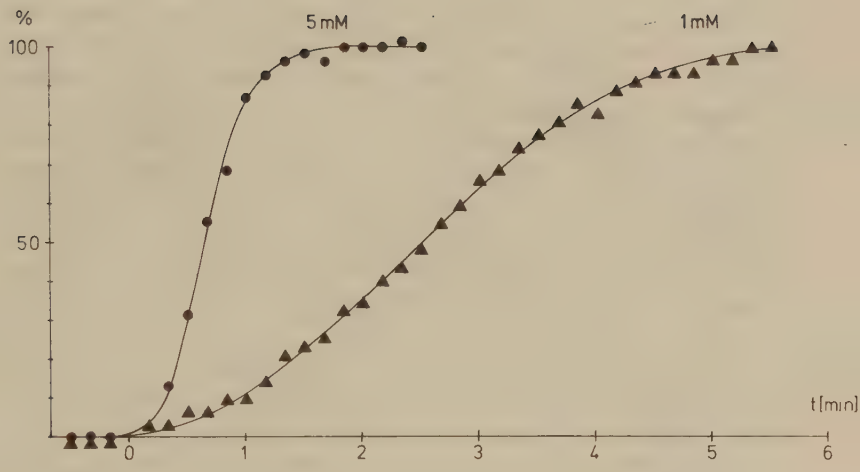


Abb. 6

Kontraktionskrafterhöhung durch 4-AP

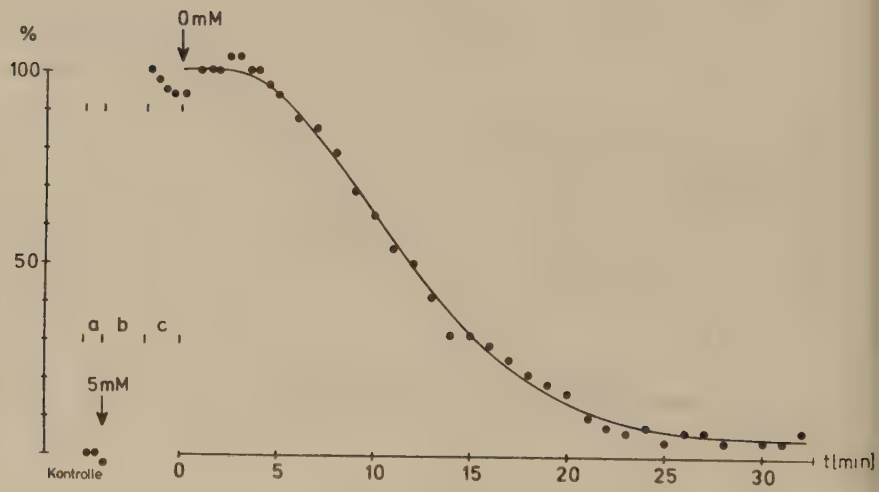
Abszisse : Zeit t [min] nach Lösungswechsel auf 4-AP Ringerlösung (Lsg. A plus 4-AP)

Ordinate : Kontraktionskrafterhöhung [%]. Die maximale Kontraktionskraftzunahme entspricht 100 %, die Kontrolle vor 4-AP Zugabe 0 %.

(●) : Kontraktionskrafterhöhung nach der Zugabe von 5 mM 4-AP (Drei-Faser-Präparat; $t_{1/2}$: 38 s).

(▲) : Kontraktionskrafterhöhung nach der Zugabe von 1 mM 4-AP (Einzelfaser-Präparat; $t_{1/2}$: 152 s)

Präparat : M. semitendinosus; Reizfrequenz: 0.1 s^{-1}; T: 22° C.



7

Abb. 7

Rückgang der Kontraktionskrafterhöhung in 4-AP-freier Ringerlösung

Abszisse : Zeit t [min] nach Lösungswechsel von einer 5 mM 4-AP-Ringerlösung auf eine 4-AP-freie Badlösung
Ordinate : Kontraktionskrafterhöhung [%]. Die maximale Kontraktionskraftzunahme entspricht 100 %, die Kontrolle vor Zugabe von 4-AP 0 %.
Zeitraum a: 50 s; b: 6 min; c: 80 s.
Präparat : M. semitendinosus; Reizfrequenz: 0.1 s^{-1}; T: 22° C.

3.1.3. Die Wirkung von 4-AP auf den Einwärtsgleichrichter

Die Kaliumleitfähigkeit der ruhenden Membran wird durch den Einwärtsgleichrichter gesteuert (s. Kap. 1.1.). Untersuchungen der Wirksamkeit von 4-AP auf den Einwärtsgleichrichter sollten Aufschluß über die Spezifität dieses Blockers geben. Da die Muskelmembran im Ruhezustand in hohem Maße für Chlorid-Ionen permeabel ist (HUTTER & NOBLE, 1960), wurden die Experimente in chloridfreien Badlösungen durchgeführt. Die Kaliumkonzentration dieser Lösungen (Lsg. D u. E, Kap. 2.2.) wurde auf 100 mM erhöht, weil mit zunehmender extrazellulärer K^+-Konzentration die Einwärtsgleichrichtung verstärkt in Erscheinung tritt (mit zunehmender Angleichung der intra- und extrazellulären K^+-Konzentration verringert sich die auswärts gerichtete "constant-field" Gleichrichtung).

Während in Normal-Ringerlösung durch 4-AP keine Erniedrigung einwärts gerichteter Ströme beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 3), zeigte sich in einigen Versuchen bei hohen Kalium-Außenkonzentrationen eine leichte Reduzierung der Ströme durch den Einwärtsgleichrichter, die jedoch nur höchstens 10-20 % der Konstrollströme betrug. In vielen Fällen konnte keine Blockierung festgestellt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß in diesen Fällen eine leichte Blockierung durch eine geringe Erhöhung der Leckleitfähigkeit nach dem Lösungswechsel überdeckt war. Lösungswechsel führten oft zur Erhöhung der Leckleitfähigkeit um 10 - 20 %.

Abb. 8 zeigt die Strom-Spannungskennlinie einer Muskelfaser in 50 mM K_2SO_4-Ringer (Lsg. D, Kap. 2.2.) vor und nach der Zugabe von 1 mM 4-AP. Demnach kann vermutet werden, daß auch der Einwärtsgleichrichter durch 4-AP geringfügig blockiert werden kann. Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Befunden von GILLESPIE & HUTTER (1975), die eine Blockierung des Einwärtsgleichrichters durch 4-AP erwähnten, ohne jedoch nähere Angaben über die Versuchsbedingungen oder den Grad der Blockierung zu machen.

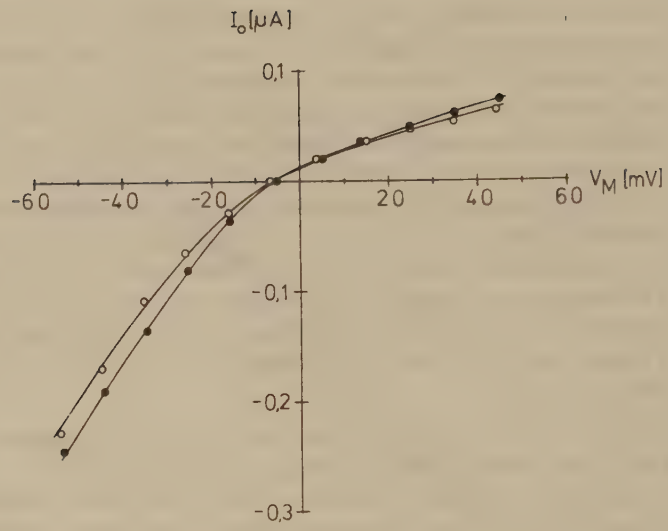


Abb. 8

"Steady-state" Strom-Spannungskennlinie einer Skelettmuskelfaser vor und nach der Zugabe von 4-AP in Badlösungen mit hoher Kaliumkonzentration (100 mM)

Abszisse: Membranpotential V_M [mV]
Ordinate: Gesamt-Membranstrom I_o [µA]
(●): Strom-Spannungskennlinie ohne 4-AP (Kontrolle)
(O): Strom-Spannungskennlinie nach der Zugabe von 4-AP (1 mM).

Die dargestellte Kurve nach 4-AP Zugabe (O) zeigt das Experiment mit der stärksten blockierenden Wirkung von 4-AP auf den Einwärtsgleichrichter, die festgestellt wurde.

Die Messung der Membranströme erfolgte am Ende eines Klemmpulses von 150 ms Dauer.

R.P.: -6 mV; H.P.: -6 mV; T: 3.8° C; Lsg. D u. E, Kap. 2.2.

3.1.4. Die Wirkungen von 2- und 3-Aminopyridin

Neben der extrazellulären Wirkung von 4-AP auf die Membranleitfähigkeit von Skelettmuskelfasern wurden in einigen Versuchen auch die Wirkungen von 2- und 3-AP untersucht. Beide Substanzen zeigten ähnliche Wirkungen wie 4-AP.

3-Aminopyridin

3-AP bewirkte neben einer Erniedrigung der "steady-state"-Ströme eine Verlangsamung der Aktivierungskinetik des verzögerten Gleichrichters. Die voltage-clamp Technik mit zwei Mikroelektroden erlaubt im Gegensatz zur 3-Mikroelektroden Technik (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970 a) keine quantitativen Aussagen über zeitliche Vorgänge. Ein qualitativer Vergleich ist jedoch möglich, zumal wenn die Ergebnisse an ein und derselben Faser ermittelt wurden. In Abb. 9 sind die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) für die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters in Abhängigkeit vom Membranpotential aufgetragen. 3-AP erhöhte die Halbwertszeit der Aktivierung beträchtlich. Im dargestellten Beispiel stieg sie in 1 mM 3-AP nach 45 min Einwirkungszeit von 34 ms auf 73.5 ms (Kurve a und c in Abb. 9, Membrandepolarisation auf -20 mV). Kurve d in Abb. 9 zeigt die Erholung der 3-AP Wirkung 65 min nach dem Lösungswechsel auf 3-AP-freie Ringerlösung. Möglicherweise läßt sich 3-AP leichter auswaschen als 4-AP, mit dem am ganzen Muskel keine Erholung der Blockierung registriert werden konnte (vgl. Kap.3.1.2). Auch 3-AP blockierte in geringem Maße (10 - 20 %) den Einwärtsgleichrichter.

2-Aminopyridin

Abbildung 10 zeigt ein Beispiel für die Wirkung von 2-Aminopyridin. Im dargestellten Experiment konnte mit 2-AP (5 mM) nach einer Einwirkungszeit von 20 min eine vollständige Blockierung der verzögerten Gleichrichtung erzielt werden (Abb. 10 C). Daneben wurde bei der ersten Aktivierung des verzögerten Gleichrichters nach dem Lösungswechsel auf 2-AP Ringer (5 mM) eine deutliche Inaktivierung des Membranstromes (nach anfänglicher

normaler Aktivierungsphase) beobachtet (Abb. 10 B). Diese Blockierungscharakteristik wurde sonst nur nach der Injektion von 4-AP registriert (vgl. Kap. 3.1.5.) und deutet deshalb möglicherweise auf eine intrazelluläre Wirkung von 2-AP hin. Da 2-AP (pK 6,71) bei einem pH von 7.2 zu ca. 75 % in der ungeladenen Form vorliegt, kann es die Lipidphase der Membran möglicherweise in größeren Mengen überqueren. Dagegen liegt 4-AP (pK 9.18) bei pH 7.2 nur zu ca. 1 % in der ungeladenen Form vor. Gegen diese Deutung spricht allerdings die Tatsache, daß 3-AP (pK 6.03) keine beschleunigte Inaktivierung erzeugte, obwohl es bei pH 7.2 zu ca. 94 % in der ungeladenen Form vorliegt. Allerdings wurde hier auch nur eine Konzentration von 1 mM (gegenüber 5 mM 2-AP) getestet. Weitere Untersuchungen z. B. systematische pH-Änderungen sind erforderlich, um dieses Problem abzukären. GILLESPIE und HUTTER (1975) beschrieben einen beschleunigten Wirkungseintritt des 4-AP Effekts bei pH 9.8.

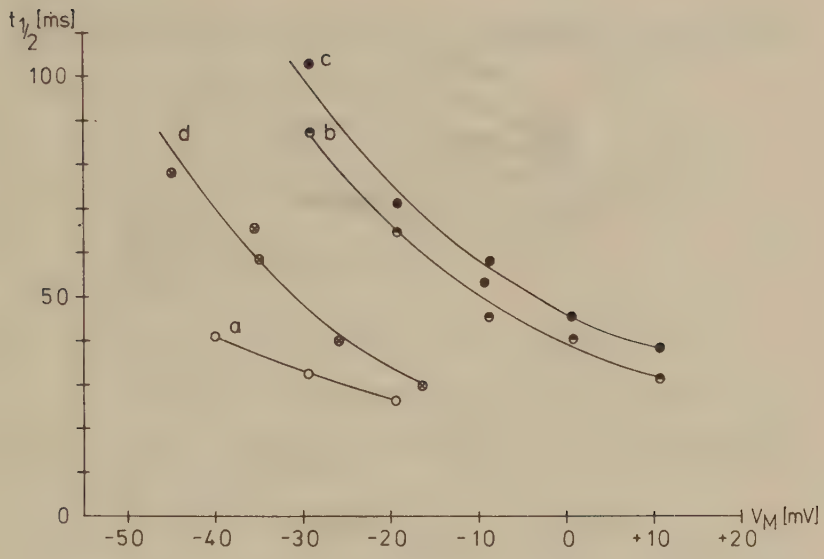


Abb. 9

Veränderung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) für die Aktivierung der verzögerten Gleichrichtung durch 3-Aminopyridin und ihre Abhängigkeit vom Membranpotential

Abszisse: Membranpotential V_M [mV].
Ordinate: Halbwertszeit für die Aktivierung des verzögerten Gleichrichters $t_{1/2}$ [ms].

a (○): Kontrolle vor Zugabe von 3-AP,
b (◓): 15 min nach der Zugabe von 3-AP (1mM),
c (●): 45 min nach der Zugabe von 3-AP (1mM),
d (⊗): 65 min nach Lösungswechsel auf 3-AP-freie Ringerlösung (Erholung).

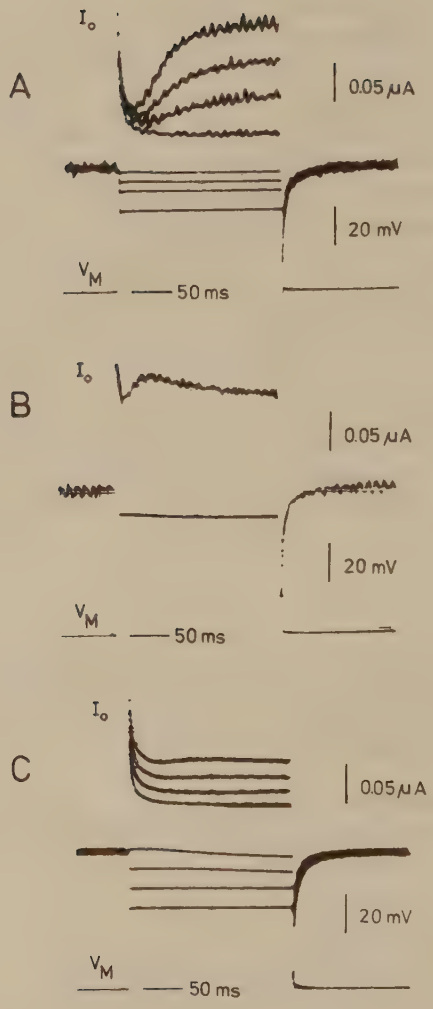

A
I_o
0.05 µA
20 mV
V_M
50 ms
B
I_o
0.05 µA
20 mV
V_M
50 ms
C
I_o
0.05 µA
20 mV
V_M
50 ms

Abb. 10

Abb. 10
Die Wirkung von 2-AP (5 mM) auf den verzögerten Gleichrichter

A - C: I_o: Gesamt-Membranstrom [µA]
V_M: Membranpotential [mV]
Zeitmaßstab: 50 ms
hyperton. Ringerlösung plus 2-AP (5 mM) (Lsg. C, Kap. 2.2.)
TTX: 10^{-7} M; T: 1.5° C
R.P.: -85 mV; H.P.: -90 mV

A: Kontrolle, Membranströme (I_o) vor Lösungswechsel auf 2-AP Ringer
Membrandepolarisationen auf -48, -38, -34 und -29 mV

B: Erster "Klemmpuls" 1 min nach Ende des Lösungswechsels auf 2-AP Ringer
Membrandepolarisation auf -30 mV.

C: Membranstrom (I_o) 12 min nach Ende des Lösungswechsels auf 2-AP Ringer
Membrandepolarisationen auf -49, -39, -30 und -22 mV

3.1.5. Die Wirkung von 4-Aminopyridin auf den verzögerten Gleichrichter bei Injektion des Blockers ins Sarkoplasma

Die eigenen Versuche zur Wirkung von 2-, 3- und 4-Aminopyridin nach extrazellulärer Zugabe als auch die Experimente von GILLESPIE und HUTTER (1975) sowie GILLESPIE (1977) ließen vermuten, daß Aminopyridine sowohl von außen als auch von der Innenseite der Zellmembran zu einer Blockierung des verzögerten Gleichrichters führen können. Extra- und intrazelluläre Wirkungen ließen sich jedoch nach extrazellulärer Zugabe der Blocker nicht eindeutig voneinander trennen, da angenommen werden konnte, daß der nichtgeladene Anteil der Blockermoleküle die Lipidphase der Membran überqueren und die Kaliumkanäle des verzögerten Gleichrichters von der Innenseite aus blockieren kann. Um die Frage nach der intrazellulären Wirkung zu klären, wurde in weiteren Experimenten 4-AP über eine dritte Glas-Mikroelektrode iontophoretisch in das Zellinnere injiziert. Eine ausführliche Beschreibung der Injektionstechnik findet sich in Kap. 2.3.2., die Zusammensetzung aller in dieser Arbeit verwendeten Injektionslösungen in Kap. 2.2..

In Abb. 11 werden drei Injektionsexperimente vorgestellt. Zunächst wurden Mikropipetten zur Injektion verwendet, die 4-AP in hoher Konzentration (520 mM) enthielten. Abb. 11 A zeigt das Ergebnis eines solchen Injektionsexperimentes. Charakteristisch war die frühzeitig und beschleunigt einsetzende Inaktivierung der Auswärtsströme (Spur 1). Sie trat nach dem Einstich der Injektionselektrode in vielen Fällen auf, obwohl noch kein Injektionsstrom geflossen war. Da eine beschleunigte Inaktivierung des verzögerten Gleichrichters in Kontrollexperimenten niemals beobachtet wurde, konnte sie nur durch passiv aus der Injektionselektrode ausgetretenes 4-AP hervorgerufen worden sein. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen die 4-AP Konzentration in den Injektionslösungen auf 1/10 bzw. 1/100 der anfänglichen Konzentration herabgesetzt. Unter diesen Bedingun-

gen trat eine spontane Hemmung der Auswärtsströme nach dem Einstechen der Injektionselektrode nicht mehr auf, und es konnten die Kontrollmembranströme vor der Injektion von 4-AP registriert werden (Abb. 11 B und C, jeweils Spur 1).

Die Injektionsversuche führten zu folgenden Ergebnissen: Die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters wurde durch injiziertes 4-AP nicht verändert. Dies wird besonders deutlich aus den in Abb.11 B u.C dargestellten Experimenten. Die jeweils mit "2" gekennzeichneten Stromspuren wurden unmittelbar nach der ersten 4-AP Injektion aufgenommen. Die Aktivierung der Auswärtsströme folgte in beiden Fällen exakt der Kontrollspur, erreichte aber nicht den maximalen Auswärtsstrom der Kontrolle, sondern trat vorher in eine Inaktivierungsphase ein. Die Anfangsgeschwindigkeit der Aktivierung des verzögerten Gleichrichters blieb aber nicht nur nach der jeweils ersten 4-AP Injektion unverändert, sondern auch bei allen darauffolgenden Aktivierungen durch einen gleichen Potentialsprung, unabhängig von der Höhe der durch 4-AP erreichten "steady-state" Blockierung. Schon die Beobachtung, daß das Maximum der Auswärtsströme jeweils etwa zur gleichen Zeit erreicht wurde, ließ vermuten, daß 4-AP die Kinetik der Aktivierung nicht verändert (s. z.B. Abb. 11 B, Spuren 1-5). In Abb. 12 ist diese Blockierungscharakteristik dadurch verdeutlicht, daß der Membranstromverlauf des Experimentes aus Abb. 11 B nach der zweiten 4-AP Injektion (Spur 3) auf den Verlauf des Kontrollstromes vor der Injektion projiziert wurde: Der maximale Auswärtsstrom nach der zweiten 4-AP Injektion wurde dem Kontrollmembranstrom (Spur 1) zum gleichen Zeitpunkt durch Multiplikation des Teststromes mit einem Skalierungsfaktor angepaßt. Alle übrigen Punkte ergaben sich durch Multiplikation mit dem gleichen Faktor. Durch diese Darstellung wird deutlich, daß die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters vor und nach der 4-AP Injektion identisch war.
Der zweite wichtige Befund betraf die Veränderung der Inaktivierungsgeschwindigkeit des verzögerten Gleichrichters. Die normale Inaktivierung folgt einem exponentiellen Zeitverlauf mit

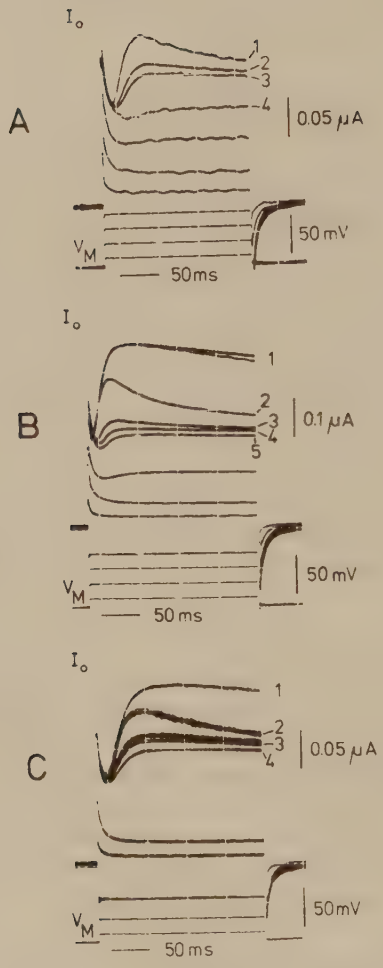

A
I_o
1
2
3
4
0.05 µA
V_M
50 mV
50 ms
B
I_o
1
2
3
4
5
0.1 µA
V_M
50 mV
50 ms
C
I_o
1
2
3
4
0.05 µA
V_M
50 mV
50 ms

Abb. 11

Abb. 11

Die Veränderung des verzögerten Gleichrichters nach intrazellulärer Zugabe von 4-AP

A - C: I_o: Gesamtmembranstrom [µA]
V_M: Membranpotential [mV]
hyperton. Ringerlösung (Lsg. B, Kap. 2.3.) TTX: 10^{-7}M.

A: Membrandepolarisationen auf -69, -50, -31 und -13 mV.
1.: erster Kontrollpuls bei V_M = -13 mV ("Inaktivierung" ohne 4-AP Injektion bei eingestochener Injektionselektrode).
2.: zweiter Kontrollpuls.
3.: dritter Kontrollpuls.
4.: I_o nach 4-AP Injektion, V_M = -13 mV.
Injektionslösung. H. (520 mM 4-AP, Kap. 2.2.)
R.P.: -70 mV; H.P.: -80 mV; T: 2.2° C.

B: Membrandepolarisationen auf -78, -59, -39 und -20 mV
1.: Kontrollpuls vor 4-AP Injektion. V_M = -20 mV
2., 3., 4., 5.: I_o nach der ersten, zweiten, dritten und vierten 4-AP Injektion, V_M = -20 mV
Injektionslösung J, Kap. 2.2. (52 mM 4-AP)
R.P.: -80 mV; H.P.: -90 mV; T: 6° C

C: Membrandepolarisationen auf -70, -51, -33 und -24 mV
1.: Kontrollpuls vor 4-AP Injektion. V_M = -24 mV
2.: I_o nach erster 4-AP Injektion. V_M = -24 mV
3., 4.: I_o ohne weitere 4-AP Injektion. V_M = -24 mV
Injektionslösung K, Kap. 2.2. (5.2 mM)
R.P.: -67 mV; H.P.: -80 mV; T: 4.7° C

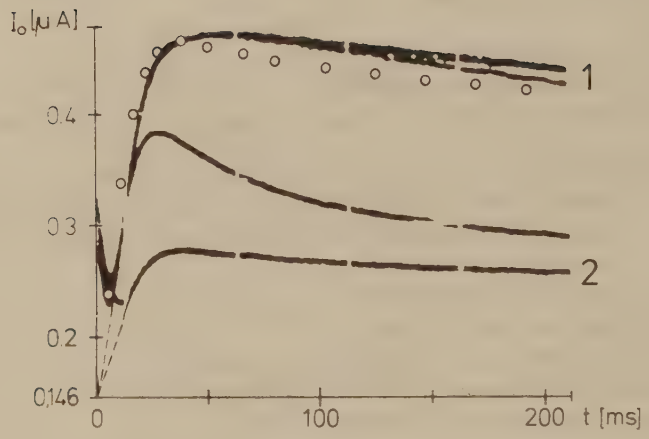


Abb. 12

Vergleich der Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters vor und nach 4-AP Injektion

Voltage-clamp Experiment B aus Abb. 11

Abszisse: Dauer des Klemmpulses t [ms]
Ordinate: Gesamtmembranstrom I_o [µA]

Die Nullinie des Membranstroms ist nicht dargestellt.
Die Abszisse verläuft auf der Höhe der extrapolierten Ruheleitfähigkeit bei einem Membranpotential von -20 mV.

1.: Kontrolle, I_o vor 4-AP Injektion, V_M: -20 mV.
2.: I_o nach der 2. 4-AP Injektion (entspricht Kurve 3, Abb. 11)
(O): ^{o} Projektion von Kurve 2 auf den Kontrollstrom (1)
Als Referenzpunkt diente der maximale Membranstrom I_o der Kurve 2.

Die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters wird durch 4-AP nicht verändert.

Zeitkonstanten zwischen 1500 und 3000 ms (hypert. Ringerlösung; 3° C; M.P.: +10 mV; ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970a). Sie beschleunigt sich bei höheren Klemmpulsen d.h. positiveren Membranpotentialen und verlangsamt sich mit abnehmender Temperatur.

Nach 4-AP Injektion inaktivierten die Membranströme bedeutend schneller (s. z.B. Abb. 11 B). Die Experimente lassen aber keine Aussage darüber zu, ob 4-AP die normale Inaktivierung des verzögerten Gleichrichters beeinflußt, oder ob die beschleunigte Abnahme der Ströme ("Inaktivierung") die Reaktion zwischen 4-AP Molekülen und dem Kaliumkanal reflektiert.
Die Inaktivierungsbeschleunigung war konzentrationsabhängig. Stromspur "2" in Abb. 11 B beschreibt den Inaktivierungsverlauf nach der Injektion von ca. 0.62 pMol 4-AP, Stromspur "2" in Abb. 11 C nach der Injektion von ca. 0.21 pMol 4-AP. Die höhere intrazelluläre Konzentration führte zu einer rascheren Inaktivierung (s. auch Abb. 14).
Abb. 13 zeigt die genaue Analyse der Inaktivierungsverläufe der Stromkurven "2" aus den Experimenten der Abb. 11 B und C. Beide Inaktivierungsverläufe ließen sich mit zufriedenstellender Genauigkeit durch eine Exponentialfunktion der folgenden Form beschreiben:

$$I_o(t) = a \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} + b \qquad (1)$$

$I_o(t)$ ist in dieser Funktion der Gesamt-Membranstrom [µA] in Abhängigkeit von der Zeit t [msec]. Der "Inaktivierungsverlauf" des Gesamtmembranstromes nach einer 4-AP Injektion wurde mit Hilfe von Funktion (1) bis zum Zeitpunkt t=0 extrapoliert. I_o beträgt zu diesem Zeitpunkt (t=0) a+b . a [µA] kennzeichnet die maximale Änderung des Gesamtmembranstromes I_o zwischen t= 0 und $t = \infty$. b [µA] kennzeichnet den Gesamtmembranstrom I_o zum Zeitpunkt t = 0.
Die Extrapolation des Membranstromverlaufs nach einer 4-AP Injektion mit Hilfe von Funktion 1 für $t \to 0$ und $t \to \infty$ führte zu

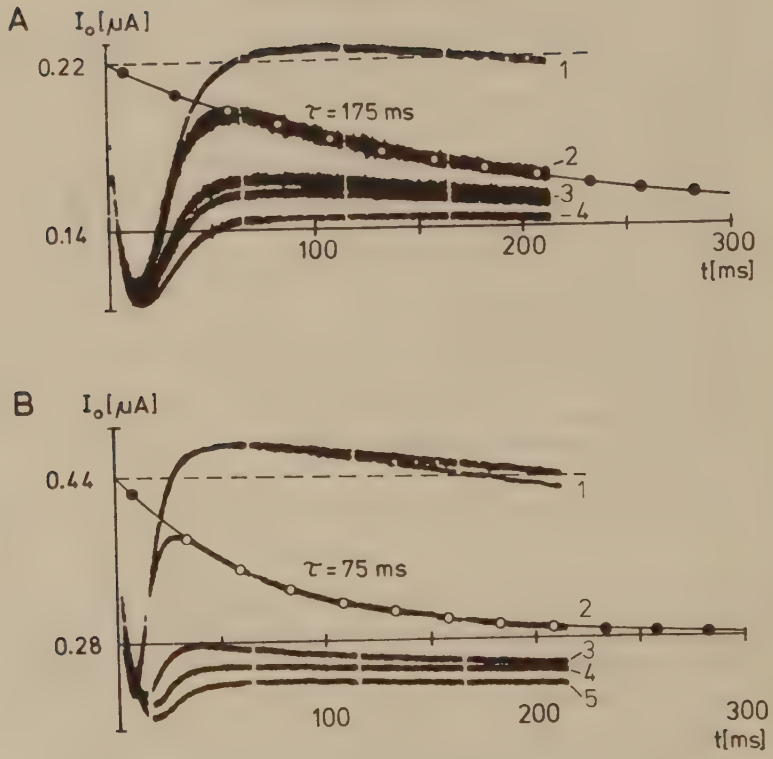

A
I_o[μA]
0.22
0.14
τ = 175 ms
1
2
3
4
100
200
300
t[ms]
B
I_o[μA]
0.44
0.28
τ = 75 ms
1
2
3
4
5
100
200
300
t[ms]

Abb. 13

Abb. 13

Analyse des "Inaktivierungsverlaufs" des verzögerten Gleichrichters nach einer 4-AP Injektion

A: Voltage-clamp Experiment C aus Abb. 11
Abszisse: Dauer des Klemmpulses t [ms].
Ordinate: Gesamtmembranstrom I_o [µA]
(●○) Funktionswerte der Funktion (1) für:
$I_o(t) = 0{,}083 \cdot 10^{-6} \cdot e^{\frac{-t}{\tau}} + 0.14 \cdot 10^{-6}$ [A]
Die Null-Linie des Membranstromes ist nicht dargestellt (gilt auch für B). Die Abszisse verläuft in Höhe des Funktionswertes der Funktion (1) für $t \rightarrow \infty$ (gilt auch für B)
Die Zeitkonstante τ [ms] des "Inaktivierungsverlaufs" betrug 175.3 ms.

B: Voltage-clamp Experiment B aus Abb. 11
Abszisse und Ordinate wie in A.
(●○) Funktionswerte der Funktion (1) für:
$I_o(t) = 0.16 \cdot 10^{-6} \cdot e^{\frac{-t}{\tau}} + 0.28 \cdot 10^{-6}$ [A]
Die Zeitkonstante τ [ms] des "Inaktivierungsverlaufs" betrug 75.1 ms.

Daten zu den 4-AP Injektionen sind in Tabelle IV angegeben:
für A, Spalte 5,
für B, Spalte 6.

zwei interessanten Ergebnissen:

1) für $t \to \infty$ strebt die Funktion 1 gegen b. Dieser I_o-Wert entspricht der maximalen Stromhöhe, die nach erneuter 4-AP Injektion und anschließender Aktivierung des verzögerten Gleichrichters durch einen Klemmsprung erreicht wird. Kurve 3 in Abb. 13 B zeigt diesen Membranstromverlauf nach der 2. 4-AP Injektion. Die Abszisse (I_o = b) in Abb. 13 B entspricht dem maximalen Auswärtsstrom von Kurve 3 und stellt den Funktionswert der Funktion 1 für $t \to \infty$ dar.

In Abb. 13 A ist ein Experiment gezeigt, in welchem 4-AP nur einmal injiziert wurde. Kurve 2 in Abb. 13 A zeigt den Verlauf des Membranstroms, der durch Funktion 1 beschrieben werden kann. Bei weiteren Aktivierungen des verzögerten Gleichrichters erreichte der Membranstrom einen "steady-state" Wert, welcher wiederum dem Funktionswert der Funktion 1 für $t \longrightarrow \infty$ entsprach (Kurve 4 in Abb. 13 A).
Dieser Wert entspricht der Abszisse (I_o = b) in Abb. 13 A. Mit anderen Worten: ist die durch eine 4-AP Injektion bewirkte "Inaktivierung" abgeschlossen (für $t \gg \tau$), so ist damit die Höhe des Auswärtsstromes einer nachfolgenden Aktivierung des verzögerten Gleichrichters vorgegeben.

2) Für $t \longrightarrow 0$ strebt die Funktion 1 gegen a+b. Dieser Funktionswert entspricht in etwa dem maximalen Auswärtsstrom der Kontrolle. Auch diese Tatsache könnte dafür sprechen, daß die 4-AP Wirkung erst mit dem Beginn der Aktivierung des verzögerten Gleichrichters einsetzt.

3.1.5.1. Reaktionskinetik der 4-AP Wirkung

Für die Analyse der 4-AP Wirkung wurde ein Modell zugrunde gelegt, welches in einer 1 : 1 Reaktion die reversible Bindung von einem 4-AP Molekül mit einem Kaliumkanal(rezeptor) beschreibt, entsprechend der Reaktionsgleichung:

$$A + B \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AB \qquad (1)$$

In dieser Gleichung steht A für die Anzahl offener (leitender) Kanäle des verzögerten Gleichrichters, B für die Anzahl an 4-AP Molekülen und AB für die Anzahl blockierter (geschlossener) Kanäle. k_1 und k_2 sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- bzw. Rückreaktion. Es wurde vorausgesetzt, daß 4-AP nur mit offenen Kanälen reagiert und die Verbindung eines 4-AP Moleküls mit dem offenen Kanal zur vollständigen Blockierung desselben führt.
Die Summe aus offenen (A) und geschlossenen Kanälen (AB) ist gleich der Gesamtanzahl an Kanälen (A_o), die an der Reaktion teilnehmen:

$$A + AB = A_o \qquad (2)$$

Die Änderung der Anzahl offener Kanäle in der Zeit beschreibt die Gleichung der Reaktionsgeschwindigkeit zu (1):

$$\frac{dA}{dt} = - k_1 \cdot A \cdot B + k_2 \cdot AB \qquad (3)$$

bzw.

$$\frac{dA}{dt} = k_2 \cdot A_o - (k_1 \cdot B + k_2) \cdot A \qquad (4)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung lautet unter der Annahme, daß sich B während des Reaktionsverlaufs praktisch nicht ändert (B = const.):

$$A(t) = A_o \cdot \left[\frac{1}{1 + KB} + \frac{KB}{1 + KB} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \right] \qquad (5)$$

mit $K = \frac{k_1}{k_2}$, $A(o) = A_o$ und

$$\frac{1}{\tau} = k_1 \cdot B + k_2 \qquad (6)$$

Im voltage-clamp Experiment ist A_o direkt proportional dem Gesamt-Membranstrom I_o vor einer 4-AP Injektion (Kontrolle). Zur Normierung der experimentellen Daten wurden die Stromwerte einer Meßserie ("steady-state"-Blockierung durch 4-AP) durch den entsprechenden Kontrollstrom vor 4-AP Injektion dividiert. Die durch 4-AP bewirkte Blockierung der Membranströme wird somit in Bruchteilen (bzw. %) der Kontrollströme angegeben. Es gilt dann:

$$\frac{A}{A_o} = \alpha, \quad \frac{A_o}{A_o} = \alpha_o = 1 \text{ (bzw. 100 \%)} \qquad (7)$$

Für die normierte Größe $\alpha(t) = \frac{A(t)}{A_o}$ folgt dann entsprechend Gleichung (5):

$$\alpha(t) = \frac{1}{1 + KB} + \frac{KB}{1 + KB} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} . \qquad (8)$$

Der Kehrwert von Funktion (6) beschreibt die Abhängigkeit der Zeitkonstanten τ für die Reaktion von 4-AP mit dem Kaliumkanal von der während eines Versuchs als konstant angenommenen 4-AP Konzentration. Die Auftragung $\frac{1}{\tau}$ gegen die intrazelluläre 4-AP Konzentration $[4\text{-AP}]_i$ ergibt eine Gerade mit der Steigung k_1 und dem Ordinatenabschnitt k_2. Abbildung 14 zeigt die entsprechende Auftragung für die experimentellen Werte von τ (Bestimmung s.Kap.3.1.5. und Abb. 13) in Abhängigkeit von $[4\text{-AP}]_i$.

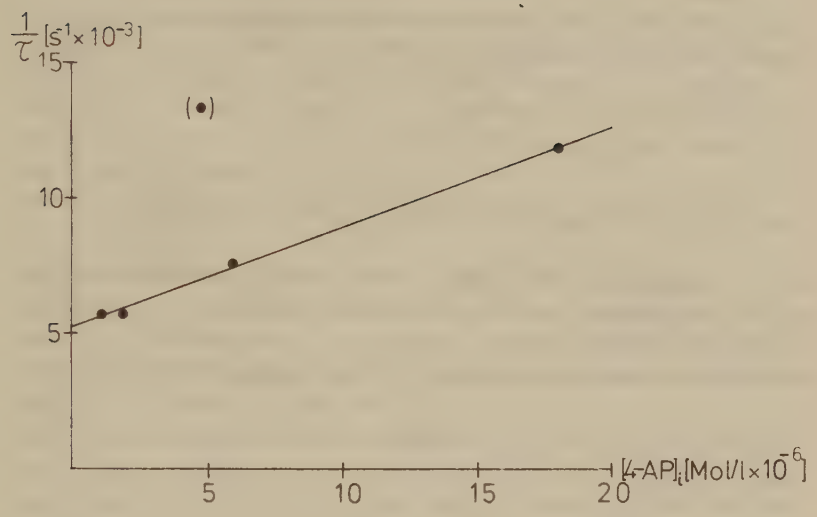


Abb. 14

Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für eine 1:1 Reaktion zwischen 4-AP Molekülen und Kanälen des verzögerten Gleichrichters

Abszisse: Intrazelluläre 4-AP Konzentration [mM].
Ordinate: Kehrwert der Zeitkonstanten für die "4-AP Inaktivierung" des verzögerten Gleichrichters [s^{-1}].

Nach Gleichung 6, Kap. 3.1.5.1. sollte die Steigung der Regressionsgeraden der experimentellen Werte k_1, der Ordinatenabschnitt der Geraden k_2 der Reaktionsgleichung 1, Kap. 3.1.5.1. angeben.
k_1 betrug 375.4 M^{-1} s^{-1}; k_2: 5.21 · 10^{-3} s^{-1}; $K_A = \frac{k_1}{k_2}$: 7.2 · 10^{-4} M^{-1}.

Der experimentelle Wert in Klammern wurde nicht zur Berechnung der Regressionsgeraden herangezogen.

Die aus der Regressionsgeraden für die experimentellen Punkte ermittelten Werte sind für $k_1 = 375.4\ s^{-1}M^{-1}$

$$\text{für } k_2 = 5.2 \cdot 10^{-3} s^{-1}$$

und für die Assoziationskonstate $K_A = \frac{k_1}{k_2} = 7.2 \cdot 10^4\ M^{-1}$.

Aus den Endwerten nach Ablauf der Blockierungsreaktion ("steady-state" Blockierung) läßt sich ebenfalls die Assoziationskonstante K_A berechnen:
Für den Gleichgewichtszustand ($t \to \infty$) der Reaktion (1) gilt:

$$\frac{d\alpha}{dt} = 0 \qquad (9)$$

Aus Gleichung (8) folgt dann:

$$\alpha_\infty = \frac{1}{1 + K \cdot B} \qquad (10)$$

Wählt man die reziproke Form von (10), so erhält man wieder eine Geradengleichung:

$$\frac{1}{\alpha_\infty} = K \cdot B + 1 \qquad (11)$$

$K = K_A$ ist die Steigung der Geraden. Für $[4\text{-AP}]_i = 0$ sollte die Gerade die Ordinate bei $\frac{1}{\alpha_\infty} = 1$ schneiden.
Abbildung 15 A zeigt die Auftragung von Gl. 11 für die experimentellen Daten aus Tabelle IV, Spalte D und E.
In Spalte D ist die "steady-state" Blockierung des verzögerten Gleichrichters durch 4-AP angegeben. Diese Werte sind der Anzahl geschlossener Kanäle (AB) proportional. Für α_∞ gilt nach Gl. 2

$$\alpha_\infty = 1 - \frac{AB}{A_o} \qquad (12)$$

Die Regressionsgerade für die Beschreibung der experimentellen Daten der Abb. 15 A schneidet die Ordinate bei 1.16. Dies ist ein Hinweis für eine gute Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem angenommenen Reaktionsmechanismus. Die aus der Steigung der Regressionsgeraden berechnete Assoziationskonstante ergibt einen Wert $K_A = 8.9 \cdot 10^4\ M^{-1}$. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die aus der Zeitkonstanten der Blockierungsreaktion bestimmte Assoziationskonstante K = $7.2 \cdot 10^4\ M^{-1}$.

Die experimentellen Daten zur Bestimmung der Zeitkonstanten der "Inaktivierung" des verzögerten Gleichrichters durch 4-AP als auch die "steady-state" Blockierung in Abhängigkeit von der intrazellulären 4-AP Konzentration sprechen somit für den angenommenen Reaktionsmechanismus einer 1:1 Reaktion.

Abbildung 15 B zeigt in einer weiteren Darstellung die Abhängigkeit der Blockierung des verzögerten Gleichrichters durch 4-AP vom Logarithmus der intrazellulären 4-AP Konzentration (Dosis-Wirkungskurve). Die Blockierung ist angegeben in $\frac{AB}{A_o} = 1 - \alpha_\infty$ Sie ist proportional der Anzahl der geschlossenen Kanäle (AB) in Gleichung (1). Die Dosis-Wirkungskurve in Abb. 15 B wurde ebenfalls nach Gleichung (1) mit einer Dissoziationskonstanten K_D von $1.1 \cdot 10^{-5}$ M berechnet. K_D ist gleich dem Kehrwert der Assoziationskonstanten für Gleichung (1) von $K_A = 8.9 \cdot 10^4\ M^{-1}$,

$$K_D = \frac{1}{K_A}$$

Die Dosis-Wirkungskurve ist eine in der Literatur häufig gewählte Darstellungsform. Die Auftragung in Form einer Geraden wie in Abb. 15 A gestattet jedoch eine bessere Abschätzung der Abweichungen der experimentellen Daten von dem angenommenen Reaktionsmechanismus.

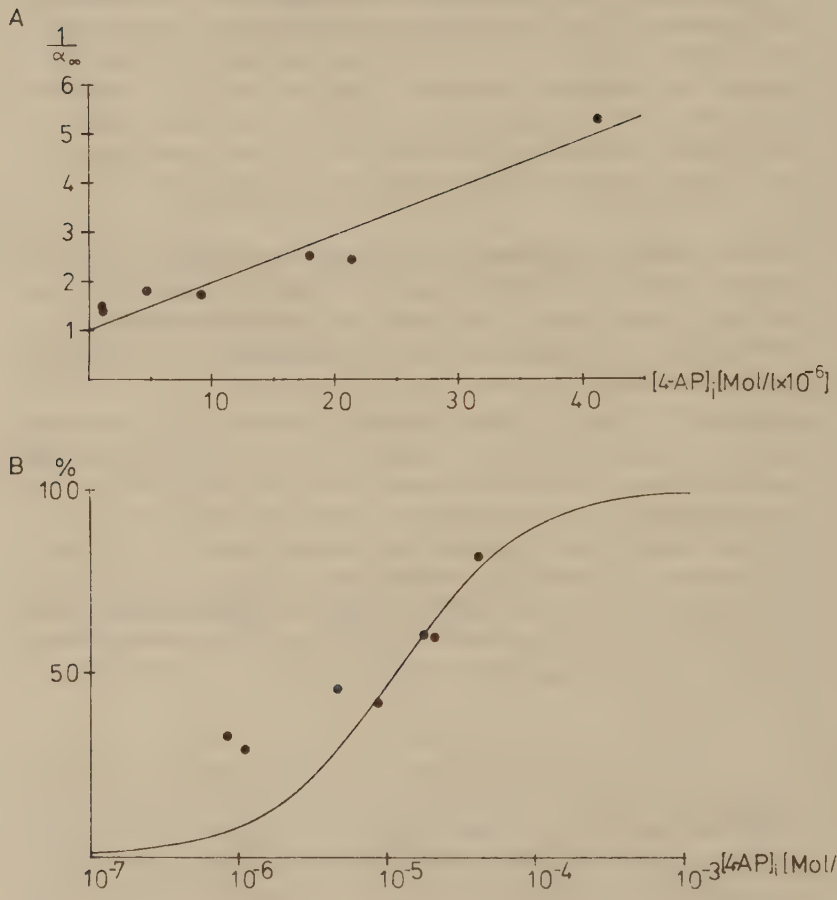

A
1/α∞
6
5
4
3
2
1
10
20
30
40
[4-AP]i [Mol/l x10⁻⁶]
B
%
100
50
10⁻⁷
10⁻⁶
10⁻⁵
10⁻⁴
10⁻³
[4AP]i [Mol/l]

Abb. 15

Abb. 15

Bestimmung der Reaktionskinetik und der Assoziationskonstanten K_A für die 4-AP Wirkung aufgrund der "steady-state"-Blockierung des verzögerten Gleichrichters durch 4-AP - Dosis-Wirkungskurve

A. Abszisse: Intrazelluläre 4-AP Konzentration [Mol/l x 10^{-6}]. Die experimentellen Daten sind Tab. IV, Spalte D entnommen.

Ordinate: $\frac{1}{\alpha_\infty}$; α_∞ : Anteil der offenen Kanüle im Gleichgewichtszustand; $\alpha_\infty = \frac{A}{A_O}$, A: Anzahl der offenen Kanäle des verzögerten Gleichrichters (vergl. Gl. 2 und 7, Kap. 3.1.5.1.).

Nach Gleichung 11, Kap. 3.1.5.1. sollte bei Zugrundeliegen einer 1:1-Reaktion die Regressionsgerade der experimentellen Werte die Ordinate bei $\frac{1}{\alpha_\infty} = 1$ schneiden. Der berechnete Schnittpunkt lag bei 1.16. Die Steigung der Regressionsgeraden ist gleich K_A (Gl. 11, Kap. 3.1.5.1.). K_A betrug 8.9 $\cdot 10^{-4}$ M^{-1}.

B. Dosis-Wirkungskurve

Abszisse: Intrazelluläre 4-AP Konzentration (logarithmische Teilung)

Ordinate: Anteil der blockierten Kanäle A in % der Kontrolle (=100 %).

$$\frac{AB_\infty}{A_O} \cdot 100 = (1 - \alpha_\infty) \cdot 100$$

Die Kurve wurde mit einer Dissoziationskonstanten $K_D = \frac{1}{K_A}$ von 1.1 $\cdot 10^{-5}$ M berechnet. Tab. IV, Spalte D enthält die verwendeten experimentellen Daten.

Tabelle IV

Daten zur Abhängigkeit der Blockierung des verzögerten Gleichrichters von der intrazellulären 4-AP Konzentration nach Injektion

	A [sec]	B [Asx10^{-9}]	C [Molx10^{-12}]	D [Mol/lx10^{-6}]	E [%]	R.P. [mV]	H.P. [mV]	F [mV]	G [mM]
1	75.0	193.5	2.0	41.2	80.6	-70	-80	-12.5	520
2	51.7	70.4	0.73	21.3	72.0	-84	-85	-18.0	520
3	62.5	70.7	0.73	17.9	60.0	-83	-85	-29.0	520
4	82.7	48.0	0.48	9.0	75.7	-80	-85	0.0	52
5	217.2	62.2	0.62	3.5	74.2	-88	-90	-20.0	52
6	310.2	19.9	0.21	1.1	44.9	-67	-80	-24.0	5.2
7	134.4	6.4	0.07	0.83	65.6	-73	-80	-4.0	52

A : Injektionsdauer
B : Die von 4-AP getragene Ladungsmenge
C : Gesamtmenge an injiziertem 4-AP
D : Intrazelluläre 4-AP Konzentration im Abstand r = 50 µm vom Injektionsort
E : Max. Blockierung des verzögerten Gleichrichters (nach Abzug der linearen Stromkomponente der Kontrollströme) angegeben in %
R.P.: Ruhepotential; H.P.: Haltepotential
F : Membranpotential während des depolarisierenden Klemmschrittes
G : 4-AP Konzentration in der Injektionselektrode

Die den Daten der Spalten B, C und D zugrunde liegenden Annahmen sind in Kap. 2.5.4. erläutert.

3.1.6. Die Wirkung von TEA auf die verzögerte Gleichrichtung nach intrazellulärer Zugabe des Blockers

Die Wirkung von TEA auf den verzögerten Gleichrichter nach extrazellulärer Zugabe ist von STANFIELD (1970 a) ausführlich untersucht worden. Obwohl STANFIELD einen extrazellulären Rezeptor für TEA vermutet, liegen doch keine Ergebnisse vor, die eine intrazelluläre Wirkung von TEA am Skelettmuskel eindeutig ausschließen.AUDIBERT-BENOIT (1972, 1973) beschrieb eine Verlängerung des Aktionspotentials nach TEA-Injektion. Diese Experimente sprechen für eine intrazelluläre Wirkung von TEA auf die Kaliumleitfähigkeit des verzögerten Gleichrichters.
Durch die Injektion von TEA in Verbindung mit voltage-clamp Experimenten konnte direkt gezeigt werden, daß intrazellulär appliziertes TEA wirkungsvoll den verzögerten Gleichrichter zu blockieren vermag (FINK & WETTWER, 1978; FINK, 1978).
Abb. 16 zeigt in drei Beispielen die Wirkung von TEA-Injektionen auf den verzögerten Gleichrichter. Aus den Membranstromregistrierungen geht deutlich hervor, daß die intrazelluläre Wirkung von TEA wesentliche Unterschiede zur Wirkung von 4-AP aufweist: In allen Injektionsexperimenten, so auch in denen der Abbildung 16, war nach jeder TEA-Injektion die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters verlangsamt. Im Gegensatz zur 4-AP Wirkung war keine Inaktivierung während der Dauer der Klemmpulse zu beobachten. Um deutlich zu machen, daß TEA die Zeitkonstante der Aktivierung des verzögerten Gleichrichters vergrößert, wurde in Abb. 17 der Auswärtsstrom nach der zweiten TEA-Injektion (Spur 2, entspricht Spur 3 in Abb. 16 A) auf den Kontrollstromverlauf (Spur 1 in Abb. 17 und Abb. 16 A) projiziert. Der Skalierungsfaktor ergab sich aus dem Vergleich der Ströme zum Ende des Klemmpulses. TEA verlangsamte deutlich die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters. Da der Auswärtsstrom nach der TEA-Injektion am Ende des Klemmpulses noch nicht seinen maximalen Wert erreicht hatte, ist die Verzögerung in Abb. 17 sogar etwas zu gering dargestellt.

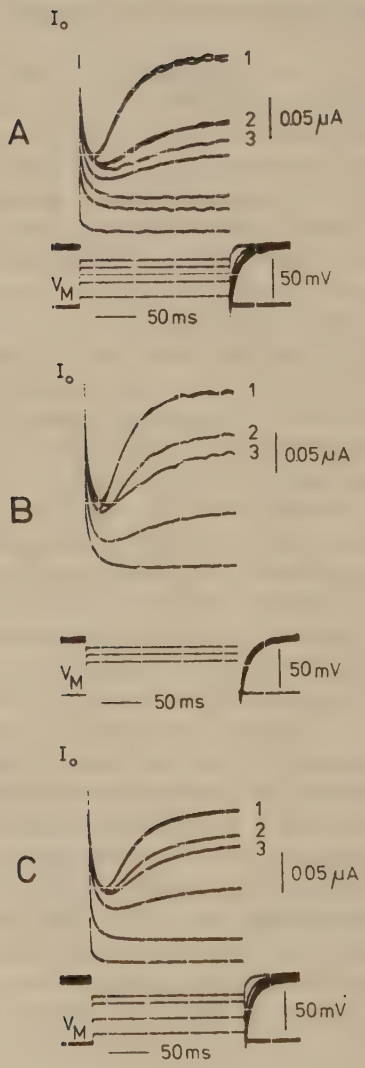

I_o
A
1
2
3
0.05 µA
V_M
50 mV
50 ms
I_o
B
1
2
3
0.05 µA
V_M
50 mV
50 ms
I_o
C
1
2
3
0.05 µA
V_M
50 mV
50 ms

Abb. 16

Abb. 16

Die Veränderung des verzögerten Gleichrichters nach intrazellulärer Zugabe von TEA

A - C: I_o: Gesamt-Membranstrom [µA]
V_M: Membranpotential [mV]
Zeitmaßstab: 50 ms
hyperton. Ringerlösung (Lsg. B, Kap. 2.2.),
TTX: 10^{-7} M; T: 1.5° C; Injektionslösung L, Kap. 2.2. (800 mM TEA).

A: Membrandepolsatisationen auf -68, -49, -40, -31 und -21 mV
1.: I_o vor TEA-Injektion (Kontrolle)
2., 3.: I_o nach der ersten und zweiten TEA-Injektion
R.P.: -76 mV; H.P.: -80 mV.

B: Membrandepolarisationen auf -40, -31 und -23 mV
1., 2., 3.: V_M -23 mV
1.: I_o vor TEA-Injektion (Kontrolle)
2., 3.: I_o nach der ersten und zweiten TEA-Injektion
R.P.: -72 mV; H.P. -80 mV

C: Membrandepolarisationen auf -70, -51, -33 und -24 mV
1., 2., 3.: V_M -24 mV
1.: I_o vor TEA-Injektion (Kontrolle)
2., 3.: I_o nach der ersten und zweiten TEA-Injektion
R.P.: -72 mV; H.P.: -80 mV

Die injizierten Stoffmengen, die intrazellulären TEA-Konzentrationen (Berechnung s. Kap. 2.5.4.) und die prozentuale Blockierung der Kontrollströme durch die jeweils erste TEA-Injektionen können aus Tabelle V entnommen werden: A, B, C: Spalten 2, 1 und 3 in Tab. V.

Für die Wirkung von TEA auf den verzögerten Gleichrichter wurde der gleiche 1 : 1 - Reaktionsmechanismus angenommen wir für 4-AP. Es gilt der in Kap. 3.1.5.1 dargestellte Formalismus, nur steht B in Gleichung (1) (Kap. 3.1.5.1.) jetzt für die Anzahl an TEA-Molekülen.

Es wurde nur die "steady-state" Blockierung des verzögerten Gleichrichters in Abhängigkeit von der intrazellulären TEA-Konzentration untersucht. Abb. 18 A und B zeigt die der Abb. 15 analoge Darstellung.

Die Regressionsgerade für die experimentellen Daten (Tab. V, Spalten C u. D) ergab einen Ordinatenschnittpunkt bei 1.04 (Abb. 18 A) und eine Assoziationskonstante K_A von $1.5 \cdot 10^4$ M^{-1}.

Die Auftragung der experimentellen Daten in einer Dosis-Wirkungskurve zeigt Abb. 18 B. Die Dissoziationskonstante der berechneten Kurve nach Gleichung (1), (Kap. 3.1.5.1.) entspricht dem Kehrwert der aus Abb. 18 A bestimmten Assoziationskonstanten und betrug $6.7 \cdot 10^{-5}$ M.

Die Bindungskonstante für TEA war etwa 6-fach kleiner als die für die 4-AP Bindung an den Kaliumkanal. Der angenommene Reaktionsmechanismus läßt sich mit den experimentellen Ergebnissen vereinbaren.

STANFIELD (1970 a) schlug für die extrazelluläre Wirkung von TEA ebenfalls eine 1:1 Reaktion vor, bestimmte allerdings eine erheblich höhere Dissoziationskonstante von $8 \cdot 10^{-3}$ M.

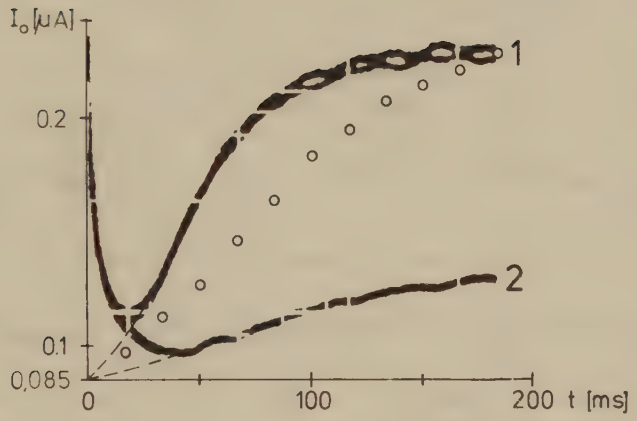


Abb. 17

Vergleich der Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters vor und nach TEA Injektion

Voltage-clamp Experiment A aus Abb. 16
Abszisse: Dauer des Klemmpulses [ms]
Ordinate: Gesamtmembranstrom I_o [µA]
Die Nullinie des Membranstroms ist nicht dargestellt.
Die Abszisse verläuft auf der Höhe der extrapolierten Ruheleitfähigkeit bei einem Membranpotential von -20 mV.

1.: Kontrolle, I_o vor TEA-Injektion; V_M = -21 mV
2.: I_o nach der zweiten TEA-Injektion (entspricht Kurve 3 in Abb. 16 A)
(o): Projektion von Kurve 2 auf den Kontrollstrom (1).
Als Referenzpunkt diente der maximale Auswärtsstrom I_o der Kurve 2.
TEA verlangsamt die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters.

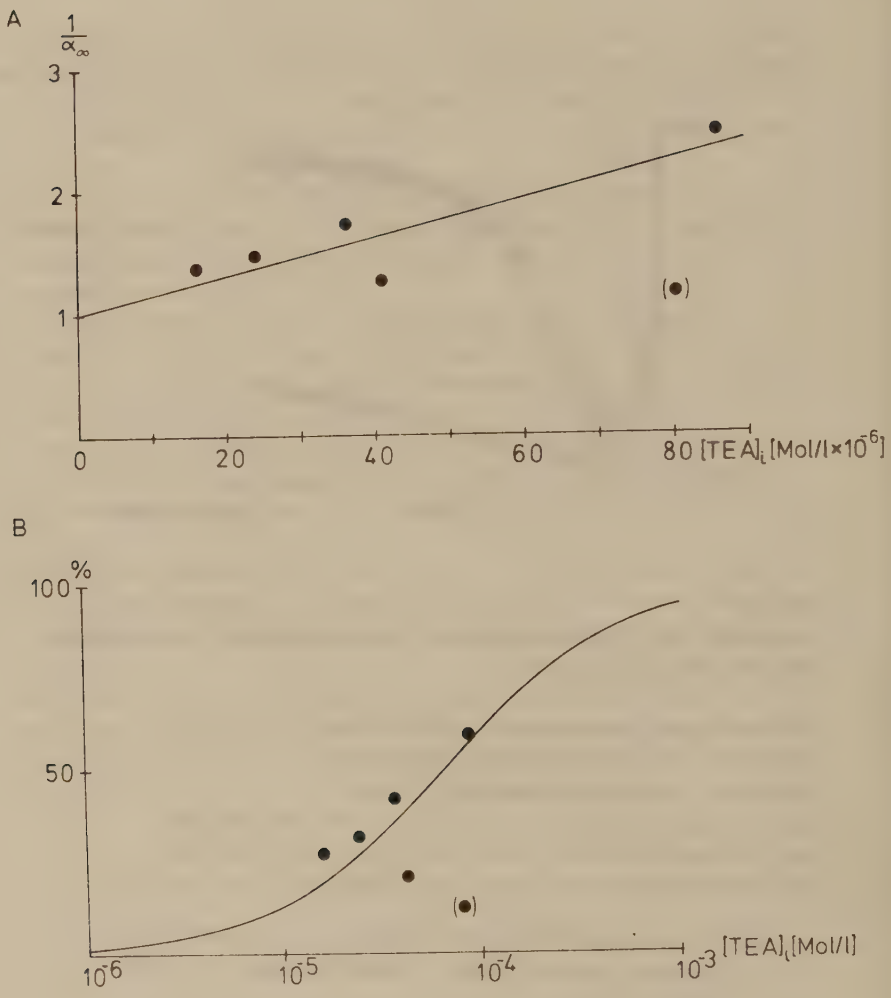

A
1/α∞
3
2
1
0
20
40
60
80 [TEA]i [Mol/l×10⁻⁶]
(●)
B
%
100
50
10⁻⁶
10⁻⁵
10⁻⁴
10⁻³ [TEA]i [Mol/l]
(●)

Abb. 18

Abb. 18

Bestimmung der Reaktionskinetik und der Assoziationskonstanten K_A für die TEA-Wirkung aufgrund der "steady-state" Blockierung des verzögerten Gleichrichters durch TEA - Dosis-Wirkungskurve

A. Abszisse: Intrazelluläre TEA-Konzentration [Mol/l $\cdot 10^{-6}$]. Die experimentellen Daten sind Tab. V, Spalte D entnommen.

Ordinate: $\frac{1}{\alpha_\infty}$; α_∞ : Anteil der offenen Kanüle im Gleichgewichtszustand; $\alpha_\infty = \frac{A}{A_o}$, A: Anzahl der offenen Kanäle des verzögerten Gleichrichters (vgl. Gl. 2 und 7, Kap. 3.1.5.1.).

Nach Gleichung 11, Kap. 3.1.5.1. sollte bei Zugrundeliegen einer 1:1-Reaktion die Regressionsgerade der experimentellen Werte die Ordinate bei $\frac{1}{\alpha_\infty} = 1$ schneiden. Der berechnete Schnittpunkt lag bei 1.04. Die Steigung der Regressionsgeraden ist gleich K_A (Gl. 11, Kap. 3.1.5.1.). K_A betrug $1.5 \cdot 10^{-4}\ M^{-1}$.

B. Dosis-Wirkungskurve

Abszisse: Intrazelluläre TEA-Konzentration (logarithmische Teilung)

Ordinate: Anteil der blockierten Kanäle A in % der Kontrolle (= 100 %).

$$\frac{AB_\infty}{A_o} \cdot 100 = (1 - \alpha_\infty) \cdot 100$$

Die Kurve wurde mit einer Dissoziationskonstanten $K_D = \frac{1}{K_A}$ von $6.7 \cdot 10^{-5}$ M berechnet. Tab. IV, Spalte D enthält die verwendeten experimentellen Daten.

Tabelle V

Daten zur Abhängigkeit der Blockierung des verzögerten Gleichrichters von der intrazellulären TEA-Konzentration nach Injektion

	A [sec]	B [Asx10^{-9}]	C [Molx10^{-12}]	D [Mol/lx10^{-6}]	E [%]	R.P. [mV]	H.P. [mV]	F [mV]
1	71.6	62.5	0.65	15.9	26.8	-72	-80	-23
2	77.6	364.9	3.78	86.1	58.7	-76	-80	-21
3	60.5	81.1	0.84	24.1	31.7	-72	-80	-24
4	98.7	190.0	1.98	35.9	41.7	-76	-80	-23
5	26.3	126.9	1.32	80.4	12.0	-81	-81	-30
6	59.7	136.1	1.41	41.0	20.6	-80	-80	-20

A : Injektionsdauer
B : Die von TEA getragene Ladungsmenge
C : Gesamtmenge an injiziertem TEA
D : Intrazelluläre TEA-Konzentration im Abstand r = 50 µm vom Injektionsort
E : Blockierung des verzögerten Gleichrichters, angegeben in % der Kontrollströme nach Abzug der linearen Stromkomponente
R.P. : Ruhepotential; H.P. : Haltepotential
F : Membranpotential während des depolarisierenden Klemmschrittes

Die den Daten der Spalten B, C und D zugrunde liegenden Annahmen sind in Kap. 2.5.4. erläutert.

3.2. Untersuchungen zur hohen Kaliumleitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern

3.2.1. Reversibilität von Kontraktilität und Membranleitfähigkeitserhöhung - Der intermediäre Erschöpfungszustand

Die von FINK und LÜTTGAU (1976) verwendete Methode zur Erniedrigung der Stoffwechselenergiereserven von Skelettmuskelfasern (Erschöpfungsmethode M1, s. Kap. 2.3.) durch Vergiftung des Stoffwechsels mit Cyanid und Monojodazetat führte irreversibel zu einer Leitfähigkeitszunahme für Kaliumionen und Hemmung der Kontrationen (Erschöpfungszustand Z3, s. Kap. 2.3.). Irreversibel ist bei dieser Erschöpfungsmethode die Blockierung der Glykolyse durch Monojodazetat. Die Hemmung der Atmungskette durch Cyanid dagegen ist reversibel.
LÜTTGAU (1965) zeigte die Reversibilität der Cyanidvergiftung bezüglich der Kontraktionsfähigkeit,und FINK (1978) erzielte eine Verdoppelung des durch der Erschöpfungsprozeß erniedrigten Membranwiderstandes nach Auswaschen des Giftes. Versuche, die Kontraktionsfähigkeit monojodazetatvergifteter und erschöpfter Muskelfasern wieder herzustellen, führten nicht zum Erfolg (HASE, unveröffentlichte Ergebnisse), jedoch beschrieb FINK (1978) eine geringe Erholung des Membranwiderstandes und der Aktivierbarkeit des verzögerten Gleichrichters.

Ein wesentliches Ziel der Untersuchungen bestand zunächst darin, Bedingungen für einen reversiblen Erschöpfungszustand zu finden. Vor allem sollte der reversible Übergang vom normal aktivierbaren verzögerten Gleichrichter (Z0) zum Zustand permanent aktivierter, hoher Membranleitfähigkeit (Z2) dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurde ausschließlich Cyanid zur Vergiftung des Stoffwechsels verwendet. Durch eine veränderte Erschöpfungsmethode (M2a) wurde ein intermediärer Zustand der Erschöpfung gefunden (Z1), von welchem aus durch Auswaschen des Stoffwechselgiftes der normale Zustand (Z0) wiederhergestellt oder aber durch kontinuierliche intrazelluläre Reizung der Übergang zur permanent

aktivierten, hohen Membranleitfähigkeit (Z2) herbeigeführt werden konnte. Eine ausführliche Beschreibung der Erschöpfungsmethoden und der verschiedenen Erschöpfungszustände Z1, Z2 und Z3 findet sich in Kap. 2.3..

Im intermediären Stadium der Erschöpfung (Z1) konnten voltageclamp Experimente durchgeführt werden, ohne daß Kontraktionsartefakte auftraten. Allerdings war es schwierig, diesen Zustand herzustellen und für längere Zeit aufrecht zu erhalten. Ein günstiges Ausgangsstadium war gegeben, wenn durch die extrazelluläre Reizung (M2a) bereits ein Leitfähigkeitsanstieg eingetreten war, aber dennoch die Aktivierung des verzögerten Gleichrichters beobachtet werden konnte. In ungünstigen Fällen erholten sich die Fasern zu rasch, so daß Kontraktionsartefakte auftraten,oder aber die Fasern waren bereits in den völlig erschöpften irreversiblen Erschöpfungszustand (Z3) übergegangen, zeigten also keine Aktivierung des verzögerten Gleichrichters mehr.

Abb. 19 soll an einem Beispiel, ausgehend vom intermediären Zustand (Z1), den Übergang von normal aktivierbaren Kanälen des verzögerten Gleichrichters zur permanent aktivierten, hohen Membranleitfähigkeit (Z2) verdeutlichen: Kurve 1 zeigt die Registrierung des Membranstroms nach dem Ende der 45-minütigen Inkubationszeit in 4 mM Cyanid-Ringer und anschließender extrazellulärer Reizung bis zum Verschwinden von Kontraktionen (M2a). Der verzögerte Gleichrichter wurde durch diesen Kontrollpuls deutlich aktiviert. Ausgehend von diesem Stadium (Z1) wurde die Erschöpfung durch intrazelluläre Reizung (M2b) fortgesetzt: Durch wiederholte Klemmschritte (Frequenz 2-4 s^{-1}, Dauer 100 ms) wurden die Fasern auf Membranpotentiale zwischen 0 und +20 mV depolarisiert. Im dargestellten Beispiel betrug die Reizfrequenz 2 s^{-1}, das Membranpotential während des Klemmschrittes +15 mV. Es sind die Membranstromverläufe zu drei Zeitpunkten dargestellt: nach 10 (Kurve 2), nach 20 (Kurve 3) und nach 30 Klemmpulsen (Kurve 4). Das Erscheinungsbild ist zunächst etwas verwirrend. Betrachtet man nur die ersten 20 Millisekunden der Membranstromregistrierungen,

so stellt man mit zunehmender Anzahl an Reizen eine kontinuierliche Membranleitfähigkeitszunahme fest. Die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters verschwindet. Die Membranströme zum Ende des Klemmpulses (steady-state) dagegen sind nach 10 Pulsen (Kurve 2) kleiner als der Kontrollwert und erreichen bzw. übersteigen ihn erst bei andauernder intrazellulärer Reizung (Kurve 3 und 4).

Dieser Verlauf der Membranströme läßt sich jedoch mit der Annahme erklären, daß während der intrazellulären Reizung zwei Prozesse parallel ablaufen: zum einen der Übergang von Kanälen in einen permanent leitfähigen Zustand, zum anderen der Übergang von aktivierbaren Kanälen in den inaktivierten Zustand, die erst bei fortgesetzter Reizung in den permanent offenen Zustand übergehen. Diese Vorstellung wird durch folgende Beobachtungen unterstützt: Auch an nicht erschöpften Muskelfasern führt die wiederholte Aktivierung (Frequenz 2-4 s^{-1}) zur Inaktivierung des verzögerten Gleichrichters (WETTWER, eigene Versuche; ALMERS, 1976). Verhindert man, wie mit den folgenden Experimenten gezeigt wird, durch EGTA-Injektionen den Übergang zur permanent aktivierten, hohen Membranleitfähigkeit, so führt die intrazelluläre Reizung ebenfalls zur Inaktivierung des verzögerten Gleichrichters (vgl. Abb. 22B). Eine weitergehende Analyse des Leitfähigkeitsübergangs erfolgt in Kap. 4.2.2.. Die Reversibilität dieses Übergangs dokumentiert Kurve 5 in Abb.19. Nach einer reizfreien Pause von 3 min war der Membranstromverlauf mit der Kontrolle vor Beginn der intrazellulären Reizung identisch.

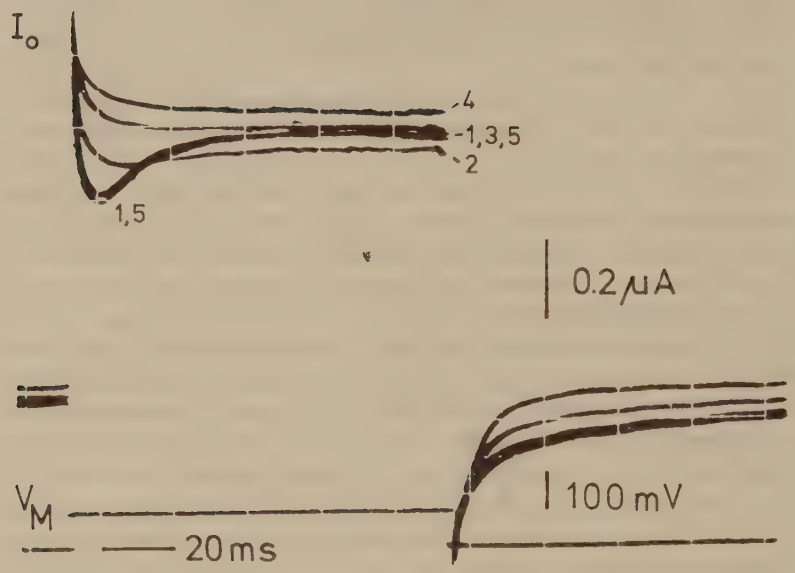


Abb. 19
Der reversible Übergang des verzögerten Gleichrichters in den Zustand permanent hoher Leitfähigkeit (Z 2), ausgehend vom intermediären Zustand der Erschöpfung (Z 1)

I_o : Gesamtmembranstrom [µA]; V_M: Membranpotential [mV]; Zeitmaßstab: 20 ms; R.P.: 67 mV; H.P.: -80 mV; Cyanid-Ringerlösung (Lsg. F, Kap. 2.2.), TTX: 10^{-7} M.

Spur 1: Kontrolle, Membranstromverlauf I_o im intermediären Zustand der Erschöpfung, hervorgerufen durch Erschöpfungsmethode M2a. Deutliche Aktivierbarkeit des verzögerten Gleichrichters.

Spur 2: I_o nach 10 Reizpulsen durch intrazelluläre Reizung (M2b). Geringe Inaktivierung des Membranstromes im "steady-state".

Spur 3: I_o nach 20 Reizpulsen. Permanent hohe Membranleitfähigkeit.

Spur 4: I_o nach 30 Reizpulsen. Geringe Erhöhung des "steady-state"-Stromes.

Spur 5: I_o nach einer Reizpause von 3 min. Erholung von der Erschöpfungsprozedur. Spur 5 ist identisch mit Spur 1.

3.2.2. Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration durch EGTA-Injektionen

3.2.2.1. Kontraktionsschwellenverschiebung normaler Skelettmuskelfasern nach EGTA-Injektionen

Zunächst wurde EGTA in normale Muskelfasern injiziert, um die Wirksamkeit der EGTA-Injektionen nachzuweisen. Als Maß diente die Kontraktionsschwelle, das Membranpotential, bei dem eine Kontraktion bei 100-facher Vergrößerung sichtbar wurde. Die Fasern wurden durch kurze voltage-clamp Pulse (Dauer ca. 70 ms) bis zur Kontraktionsschwelle depolarisiert. Die Spannungsentwicklung einer Muskelfaser in Abhängigkeit vom Membranpotential wird durch eine sigmoid verlaufende Aktivierungskurve beschrieben (LÜTTGAU & OETLIKER, 1968). Deshalb ist zu erwarten, daß am Schwellenpotential die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration einen Schwellenwert erreicht, der ausreicht, eine gerade noch sichtbare Kontraktion auszulösen. Durch injiziertes EGTA sollte die durch eine Membrandepolarisation freigesetzte Ca^{2+}-Menge teilweise gebunden werden. Damit stünde nicht mehr genügend Kalzium für die Bindung am Troponin und damit zur Kontraktionsauslösung zur Verfügung. Erst bei stärkeren Membrandepolarisationen könnte aufgrund einer größeren Ca^{2+}-Freisetzung wieder die Schwellenkonzentration erreicht werden. Deshalb sollte eine Injektion von EGTA zu einer Verschiebung der Kontraktionsschwelle zu positiveren Membranpotentialen führen. Abb. 20 zeigt das Ergebnis der EGTA-Injektionen: Die Kontraktionsschwelle verschob sich im dargestellten Beispiel um ca. 40 mV in depolarisierender Richtung. Die Schwellenverschiebung war reversibel.
Neben dem deutlichen Effekt auf die Kontraktionsschwelle ließ sich aus diesem Experiment ein weiteres wichtiges Ergebnis ablesen, welches im Rahmen dieser Arbeit aber nur kurz erwähnt werden soll: Der verzögerte Gleichrichter wurde durch die EGTA-Injektionen nur wenig beeinflußt und war bereits unterhalb der Kontraktionsschwelle maximal aktiviert. Dies geht aus der Strom-

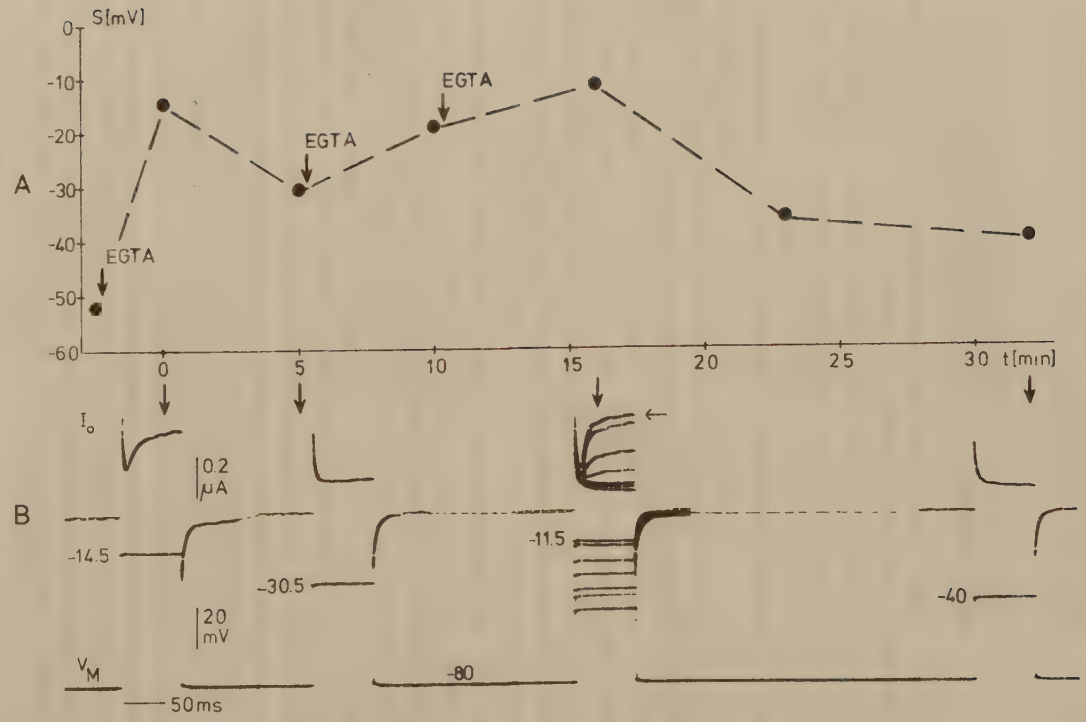

S[mV]
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
A
EGTA
EGTA
EGTA
0
5
10
15
20
25
30 t[min]
I_o
0.2 µA
B
-14.5
-30.5
-11.5
-40
20 mV
V_M
50ms
-80

Abb. 20

Abb. 20

Reversible Erhöhung der Kontraktionsschwelle einer normalen Faser nach EGTA-Injektion

A: Abszisse: Zeitskala t [min]

Ordinate: Kontraktionsschwelle S [mV].
Definition: Membranpotential V_M, bei welchem unter Versuchsbedingungen eine gerade noch sichtbare Kontraktion ausgelöst werden kann.

B: Original voltage-clamp Registrierungen

I_o: Gesamt-Membranstrom [µA]; V_M: Membranpotential [mV]. Das Schwellenpotential ist jeweils beziffert. Der bei der Kontraktionsschwelle fließende Membranstrom ist in einem Fall mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Maximale Schwellenverschiebung: von -52 mV (Kontrolle) auf -11.5 mV nach der dritten EGTA-Injektion.
R.P.: -75 mV; H.P.: -80 mV; T: 10^{o} C; TTX: 10^{-7} M; normale Ringerlösung (Lsg. A, Kap. 2.2.).

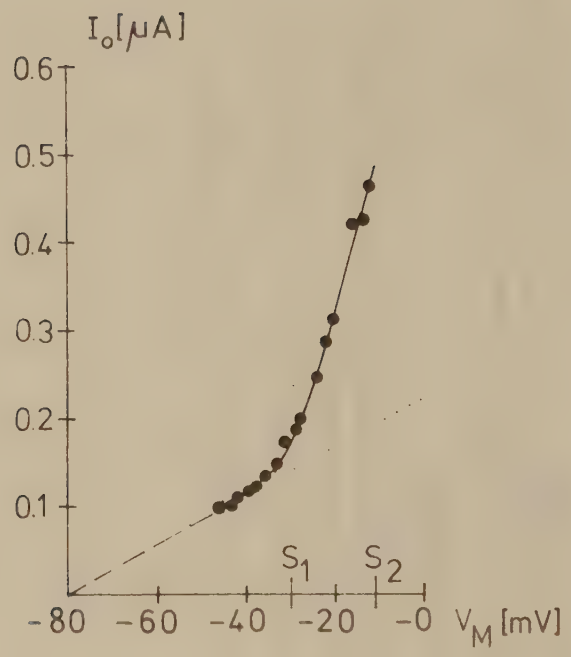


Abb. 21
Strom-Spannungskennlinie einer normalen Faser nach EGTA-Injektion

Abszisse: Membranpotential V_M [mV].
Ordinate: Gesamt-Membranstrom I_o [µA] in Auswärtsrichtung
S_1: Schwelle für die Aktivierung des verzögerten Gleichrichter. (Definition: V_M, bei welchem I_o um 25 nA vom anfänglich linearen Teil der I-U-Kennlinie abweicht.)
S_2: Kontraktionsschwelle. (Definition s. Abb. 20)
R.P.: -75 mV; H.P.: -80 mV; T: 10° C; TTX: 10^{-7} M. Normal-Ringerlösung (Lsg. A, Kap. 2.2.)
S_1 betrug -30 mV, S_2 -11.5 mV.

Spannungs-Kennlinie auswärtsgerichteter Membranströme in Abb.21 hervor. Obwohl auch die Schwelle für die Aktivierung des verzögerten Gleichrichters in depolarisierender Richtung verschoben war, betrug der Abstand zur Kontraktionsschwelle bei maximaler Verschiebung durch EGTA fast 20 mV.
Dieses Versuchsergebnis spricht gegen eine funktionelle Kopplung der Aktivierung von verzögertem Gleichrichter und Kontraktionsaktivierung. Die Möglichkeit einer kausalen Verbindung war oft Gegenstand experimenteller Untersuchungen (COSTANTIN, 1968; KAO & STANFIELD, 1968, 1970), da das Schwellenpotential beider Prozesse bei ca. -50 mV liegt.

3.2.2.2. Die Wirkung von EGTA-Injektionen auf die Membranleitfähigkeit im intermediären Zustand der Erschöpfung

Die deutliche und nahezu vollständig reversible Verschiebung der Kontraktionsschwelle normaler Muskelfasern nach EGTA-Injektionen rechtfertigte die Annahme, daß mit dieser Methode $[Ca^{2+}]_i$ wirkungsvoll erniedrigt werden kann. In weiteren Versuchen wurde deshalb EGTA in Muskelfasern injiziert, die in den intermediären Erschöpfungszustand (Z1) gebracht worden waren. Es sollte geprüft werden, ob durch eine Erniedrigung der intrazellulären freien Kalziumkonzentration die Entstehung der permanent aktivierten, hohen Membranleitfähigkeit (Z2) verhindert werden kann. Abb. 22 A zeigt zunächst als Kontrollexperiment die Reversibilität des Erschöpfungsprozesses durch intrazelluläre Reizung (M2b). Ausgehend vom intermediären Erschöpfungszustand (Z1) ist der Übergang von der Aktivierbarkeit des verzögerten Gleichrichters zum permanent leitfähigen Zustand (Z2) dargestellt. Im Verlauf von 30 Klemmpulsen (Frequenz: 2 s^{-1}) wurde ein Maximalwert der Membranleitfähigkeit erreicht (Abb. 22 A, Spur 3). Während der sich anschließenden fünfminütigen Reizpause ging die Leitfähigkeit wieder auf den Ausgangswert zurück. Auch die im Verlauf der intrazellulären Reizung stark vergrößerten einwärtsgerichteten "tail"-Ströme, die nach Repolarisation der Membran auf das Haltepotential (-80 mV) auftraten, gingen nach der Reizpause auf den Kontrollwert zurück (s. auch Kap. 3.2.4.). Dieser reversible Übergang zur permanent aktivierten, hohen Membranleitfähigkeit (Z2) konnte an ein und derselben Faser mehrere Male ausgelöst werden.

Abb. 22 B zeigt die Wiederholung des Erschöpfungsexperiments an derselben Muskelfaser, nachdem EGTA injiziert worden war (experimentelle Daten siehe Bildunterschrift). EGTA verhinderte jedoch den Übergang in den Zustand permanent aktivierter hoher Membranleitfähigkeit. Die wiederholte Reizung (M2b) bewirkte stattdessen eine vollständige Inaktivierung des verzögerten Gleichrichters. Eine entsprechende Inaktivierung beobachtet man auch

an normalen Muskelfasern, wenn der verzögerte Gleichrichter mit ähnlich hoher Frequenz aktiviert wird (vgl. hierzu Kap. 3.2.1. u.4.2.2.). Durch die EGTA-Injektion wurde auch die Verlängerung der "tail"-Ströme während der intrazellulären Reizung (M2b) verhindert.

Im weiteren Verlauf des Experiments sollte gezeigt werden, inwieweit die diffusionsbedingte Erniedrigung der intrazellulären EGTA-Konzentration am Injektionsort die Rückkehr zum permanent aktivierten hohen Leitfähigkeitszustand (Z2) erlaubte. Nach einer reizfreien Pause von 20 min im Anschluß an die EGTA-Injektion, während der die Membran auf einem Haltepotential von -80 mV gehalten wurde, konnte der verzögerte Gleichrichter durch erneute Wiederholung des Erschöpfungsexperimentes (M2b) wieder in den Zustand (Z2) überführt werden (Abb.22 C). Eine Analyse der Stromverläufe erfolgt in Kapitel 4.2.2.. EGTA-Injektionen bewirkten darüberhinaus eine Normalisierung der Strom-Spannungs-Kennlinie. In Abb.23 werden die Strom-Spannungskennlinien für auswärtsgerichtete Membranströme im intermediären Zustand der Erschöpfung vor und nach EGTA-Injektion verglichen. Nach EGTA-Injektion verringerte sich die Ruheleitfähigkeit der Membran, so daß das Einsetzen der verzögerten Gleichrichtung deutlicher hervortrat.

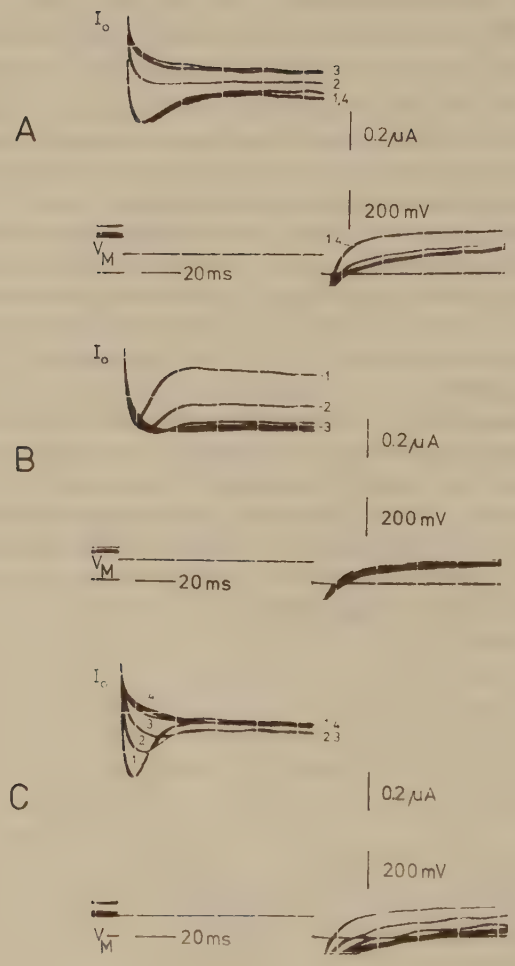

A
I_o
3
2
1,4
0.2 µA
200 mV
V_M
20 ms
B
I_o
1
2
3
0.2 µA
200 mV
V_M
20 ms
C
I_o
0.2 µA
200 mV
V_M
20 ms

Abb. 22

Abb. 22

EGTA-Injektionen im intermediären Zustand der Erschöpfung (Z1)

A - C: I_o: Gesamtmembranstrom [mA]; V_M: Membranpotential [mV]; Zeitmaßstab: 20 ms; R.P.: -67 mV; H.P.: -80 mV; T: 10° C; Normal-Ringerlösung plus Cyanid (4 mM) (Lsg. F, Kap. 2.2.) Injektionslösung M, Kap. 2.2.; TTX: 10^{-7} M. Ausgangszustand der Membranleitfähigkeit: Z1 (nach dem Ende der extrazellulären Reizung, (M2a, s. Kap. 2.5.).

A: 1.: Kontrolle, Membranstromverlauf nach M2a
2.: I_o nach 10 Klemmpulsen (Frequenz: 2 s^{-1}), intrazelluläre Reizung (M2b).
3.: I_o nach 30 Pulsen (M2b). Übergang der Faser in Zustand Z2 (permanent aktivierte, hohe Leitfähigkeit, Ausbildung von "tail"-Strömen).
4.: I_o nach einer Pause von 5 min (Erholung, Rückkehr zu Z1)

B: Erschöpfungsversuch durch intrazelluläre Reizung (M2b) 3 min nach einer EGTA-Injektion
1.: Kontrolle, I_o nach M2a
2.: I_o nach 10 Pulsen (M2b), Frequenz: 2 s^{-1}
3.: I_o nach 30, 50, 70 und 90 Pulsen
Zustandswechsel von Z1 nach Z2 ist nicht möglich. Der verzögerte Gleichrichter inaktiviert. Membrandepolarisation auf + 25 mV.

C: Erschöpfungsversuch durch intrazelluläre Reizung (M2b) 20 min nach einer EGTA-Injektion.
1.: Kontrolle, I_o nach M2a
2.: I_o nach 10 Pulsen (M2b, Frequenz 2 s^{-1})
3.: I_o nach 30 Pulsen
4.: I_o nach 50, 70 und 90 Pulsen
Kontinuierlicher Übergang von Zustand Z1 zu Z2 wieder möglich. Membrandepolarisation auf +25 mV. Änderung der freien intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (s. Kap. 2.6.3.):
A: Es wurde eine Ausgangskonzentration von 10^{-7}M angenommen.
B: Abnahme durch EGTA-Injektion auf $5 \cdot 10^{-9}$M.
C: Erhöhung (durch diffusionsbedingte Erniedrigung der EGTA-Konzentration am Ort der Messung) auf $0.95 \cdot 10^{-7}$M.

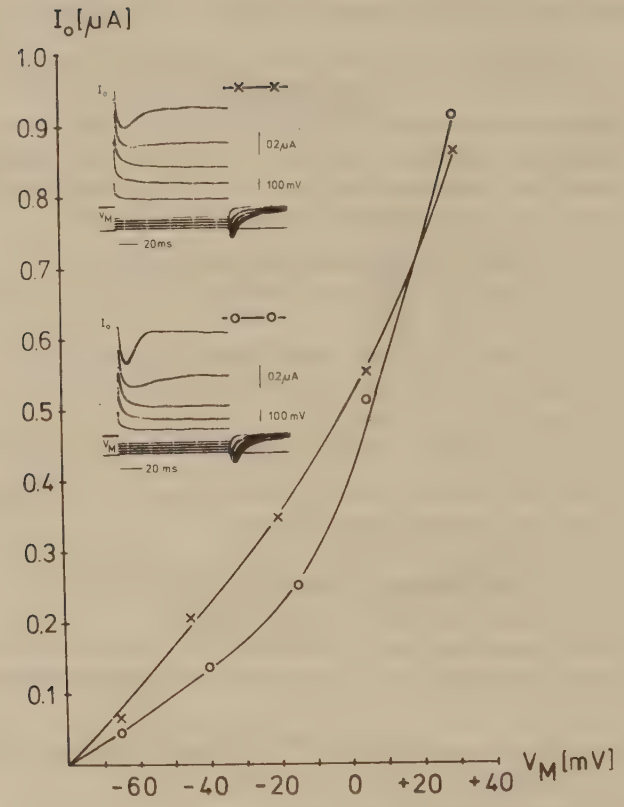


Abb. 23

Normalisierung der Strom-Spannungskennlinie nach EGTA-Injektion

Abszisse: Membranpotential V_M [mV]

Ordinate: Gesamt-Membranstrom I_o [µA]

-x-x- Verlauf der I-U-Kennlinie und Original-Membranstromregistrierung im intermediären Zustand der Erschöpfung (Z1) nach extrazellulärer Reizung (M2a)

-o-o- Verlauf der I-U-Kennlinie und Original-Membranstromregistrierung nach einer EGTA-Injektion.

Zeitmaßstab der Originalregistrierungen: 20 ms
R.P.: -67 mV; H.P.: -80 mV; T: 10° C; TTX: 10^{-7} M; Lsg. F, Kap. 2.2.

3.2.2.3. Konzentrationsverteilung von EGTA und intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration nach EGTA-Injektionen

Abb. 24 zeigt die berechneten Diffusionsprofile nach EGTA-Injektionen. Die den Berechnungen zugrundeliegenden Annahmen sind in Kap. 2.5.2. erläutert.

Die Kurven 1 und 2 zeigen die Konzentrationsverteilung jeweils direkt im Anschluß an eine Injektion. Im ersten Fall (Injektion 1, Kurve 1) betrug die injizierte Gesamtladungsmenge 46 440 $\cdot 10^{-9}$ As. Die Wirkung dieser Injektion ist in Abb. 22 B dargestellt. Die Berechnung ergab, daß in einem Abstand r = 50 µm vom Ort der Injektion die Konzentration an EGTA zum Ende von Injektion 1 0.71 mM betrug. Unter den gewählten Annahmen berechnete sich daraus eine freie intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration von 5 $\cdot 10^{-9}$ M (Kap. 2.5.3.).

Im zweiten Fall (Injektion 2, Kurve 2) betrug die injizierte Gesamtladungsmenge 24 365 $\cdot 10^{-9}$ As. Kurve 3 zeigt das Konzentrationsprofil 20 min nach dem Ende von Injektion 2. Die Membranströme zu diesem Zeitpunkt sind in Abb. 22 C dargestellt. Die Berechnung ergab, daß in einem Abstand r = 50 µm vom Injektionsort die Konzentration an EGTA in dieser Zeit von 0.65 mM auf 2.6 µM absank. Das bedeutet, daß bei den gewählten Annahmen eine Abnahme der EGTA-Konzentration nahe der Injektionselektrode auf 0.4 % des Anfangswertes in einem Diffusionszeitraum von 20 min zu erwarten ist. Als Folge davon sollte die freie Ca^{2+}-Konzentration in der gleichen Zeit von 5.4 $\cdot 10^{-9}$ M auf 0.95 $\cdot 10^{-7}$ M ansteigen.
Weitere experimentelle Daten zu Injektion 1 und 2 finden sich in der Bildunterschrift zu Abb. 24.

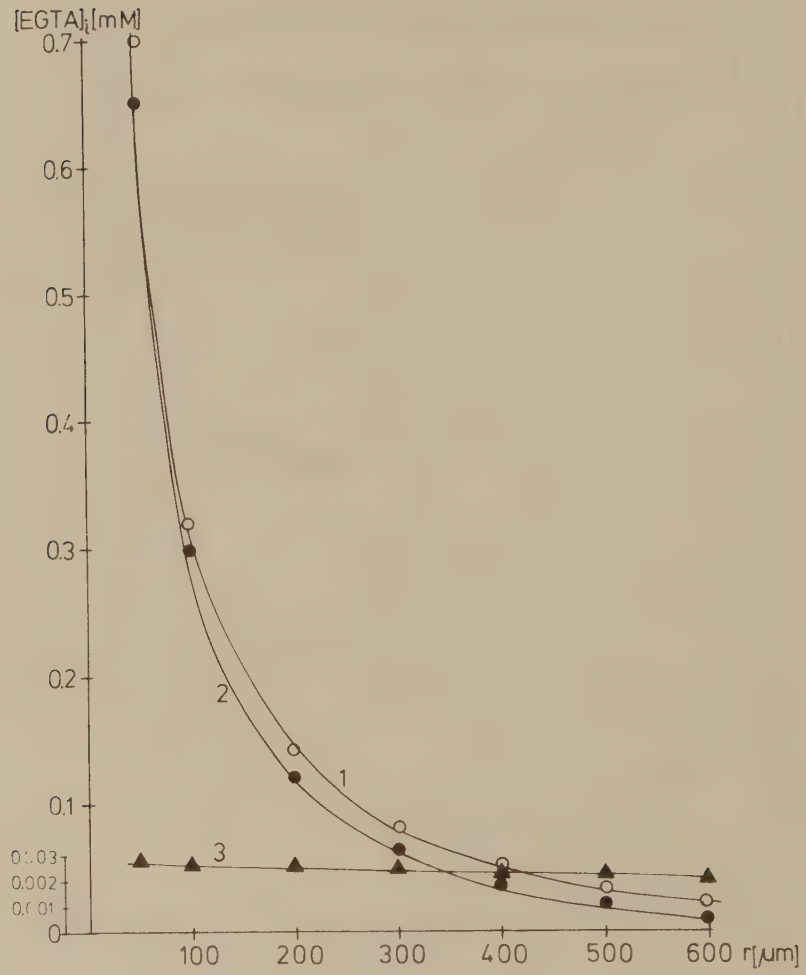

[EGTA]i [mM]
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.03
0.002
0.001
0
100
200
300
400
500
600
r[µm]
1
2
3

Abb. 24

Abb. 24

Intrazelluläre Konzentrationsverteilung von EGTA - Diffusionsprofile von zwei EGTA-Injektionen

Abszisse: Abstand r [µm] vom Ort der Injektion.
Ordinate: intrazelluläre EGTA-Konzentration [µM].

Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 2, Kap. 2.5.2.:

$$[EGTA]_i\ (r) = \frac{q}{4\pi \cdot Dr} \cdot \operatorname{erfc} \frac{r}{2\sqrt{Dt}}$$

q: pro Zeiteinheit injizierte Stoffmenge [Mol s^{-1}]
D: Diffusionskoeffizient [$cm^2 s^{-1}$]

Kurve 1 (○): Konzentrationsverteilung einer EGTA-Injektion direkt nach dem Ende der Injektion.
t: 475 s; M: 103.1 · 10^{-12} Mol; D: 4.6 · 10^{-6} cm^2 s^{-1}
q: 2.17 · 10^{-13} Mol s^{-1}.
Die Wirkung dieser Injektion zeigt Abb. 22 B.

Kurve 2 (●): Konzentrationsverteilung einer EGTA-Injektion direkt nach dem Ende der Injektion. t: 270 s; M: 55.2 · 10^{-12} Mol; D: 4.6 · 10^{-6} cm^2 s^{-1}; q: 2.06 · 10^{-13} Mol s^{-1}.

Kurve 3 (▲): Konzentrationsverteilung der in Kurve 2 dargestellten Injektion 20 min nach dem Ende der Injektion. Die Membranströme zu diesem Zeitpunkt zeigt Abb. 22 C. Für Kurve 3 gilt der gestreckte Ordinatenmaßstab links unten!

Die Berechnung der freien intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (vergl. Kap. 2.5.3.) ergab für r=50 µm folgende Werte:
Kurve 1: 5 · 10^{-9} M; Kurve 2: 5.4 · 10^{-9} M; Kurve 3: 0.95 · 10^{-7} M.

3.2.3. Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration durch Coffein und Ca-EGTA Injektionen

3.2.3.1. Die Wirkung von Coffein auf die Membranleitfähigkeit im intermediären Zustand der Erschöpfung

Für die folgenden Versuche wurde vorausgesetzt, daß Coffein die Muskelmembran leicht passieren kann (BIANCHI, 1961, 1962) und eine Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration durch Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum bewirkt (HERZ & WEBER, 1965; LÜTTGAU & OETLIKER, 1968; ZACHAR, 1971; ENDO, 1977).

Zunächst wurden die Muskeln wiederum in den intermediären Erschöpfungszustand (Z1) gebracht. In Abb.25 A sind auswärts gerichtete Membranströme vor Zugabe von Coffein dargestellt. Der verzögerte Gleichrichter befand sich im aktivierbaren Zustand. Nach der Zugabe von Coffein (1.5 mM) erhöhte sich deutlich die Ruheleitfähigkeit der Membran, die "tail"-Ströme vergrößerten sich (Abb.25 B). Die kontinuierliche Membranleitfähigkeitserhöhung durch Coffein ohne intrazelluläre Reizung zeigt besonders deutlich das Beispiel der Abb.25 C. Die Voltage-clamp Schritte depolarisierten die Membran auf -5 mV. Die Membranströme wurden 3, 6 und 9 min nach der Zugabe von Coffein registriert. Der Eingangswiderstand erniedrigte sich von ca. 90 kΩ (Spur 1 in Abb.25 C) auf ca. 64 kΩ (Spur 4 in Abb. 25 C). Diese Erniedrigung des Eingangswiderstandes entspricht etwa der Halbierung des Membranwiderstandes (FINK & LÜTTGAU, 1976). Die Reversibilität des Coffein-Effekts zeigt Abb. 25 D. Im dargestellten Beispiel erholte sich der Eingangswiderstand in coffeinfreier Badlösung innerhalb von 20 min von ca. 61 auf ca. 89 kΩ.

Die Coffein-Versuche unterstützten die Hypothese einer Ca^{2+}-induzierten Kaliumleitfähigkeitserhöhung stoffwechselvergifteter und erschöpfter Skelettmuskelfasern. Die verwendete Coffeinkonzentration lag unter der Schwellenkonzentration von ca. 2 mM zur Auslösung einer Kontraktur (LÜTTGAU & OETLIKER, 1968), somit waren Kontraktionsartefakte ausgeschlossen.

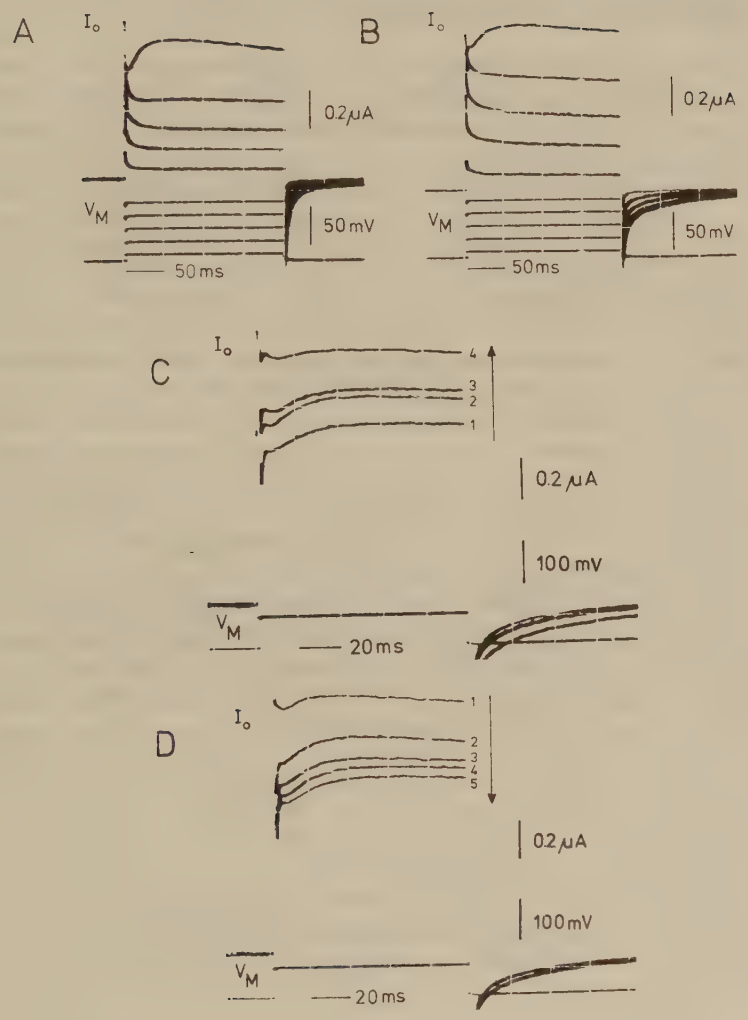

A
I_o
0.2 µA
V_M
50 mV
50 ms
B
I_o
0.2 µA
V_M
50 mV
50 ms
C
I_o
4
3
2
1
0.2 µA
100 mV
V_M
20 ms
D
I_o
1
2
3
4
5
0.2 µA
100 mV
V_M
20 ms

Abb. 25

Abb. 25
Coffein-Zugabe im intermediären Zustand der Erschöpfung (Z1)

A - D: I_o: Gesamtmembranstrom [µA]; V_M: Membranpotential [mV]: Zeitmaßstab: 50 ms (A u. B) bzw. 20 ms (C u. D). R.P.: -63 mV; H.P.: -80 mV; T: 10° C.

A: Intermediärer Erschöpfungszustand (Z1)
Membranströme (I_o) nach extrazellulärer Reizung (M 2a)
Membrandepolarisationen (V_M) auf -71, -55. -39, -23 und -6 mV. Normal-Ringerlösung plus Cyanid (4 mM) (Lsg. F, Kap. 2.2.)

B: Membran-Leitfähigkeitserhöhung in Coffein-Ringerlösung (1.5 mM) plus Cyanid (Lsg. G, Kap. 2.2.)
Membrandepolarisationen auf -71, -55, -39, -21 und -5 mV.

C: Spontane Leitfähigkeitserhöhung in Coffein-Ringerlösung (1,5 mM) plus Cyanid (Lsg. G, Kap. 2.2.) ohne M2b
1.: Kontrolle, I_o vor Lösungswechsel auf Lsg. G
2.: I_o 3 min nach Lösungswechsel auf Lsg. G
3.: I_o 6 min nach Lösungswechsel auf Lsg. G
4.: I_o 9 min nach Lösungswechsel auf Lsg. G
Membrandepolarisation auf -5 mV.

D: Rückgang der Membranleitfähigkeit in Coffein-freier Ringerlösung (Lsg. F, Kap. 2.2).
1.: I_o direkt nach Lösungswechsel auf Coffein-freie Ringerlösung
2-5: I_o 5 min, 10 min, 15 min und 20 min nach Lösungswechsel auf Coffein-freie Ringerlösung.
Membrandepolarisation auf -2,5 mV.

3.2.3.2. Die Wirkungen von Ca-EGTA Injektionen auf die Membranleitfähigkeit im intermediären Zustand der Erschöpfung

Die durch Coffein erzielte Membranleitfähigkeitserhöhung konnte durch Injektionsexperimente bestätigt werden, in denen die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration auf direktem Wege erhöht wurde. Zu diesem Zweck wurden Ca-EGTA/EGTA-Lösungen injiziert, die auf eine freie Ca^{2+}-Konzentration von 10^{-5} M eingestellt waren (Zusammensetzung der Injektionslösungen s. Kap. 2.2., Lsg. N).

Abb. 26 zeigt ein Beispiel für die Wirkung der Ca-EGTA-Injektion auf die Membranleitfähigkeit von Muskelfasern im intermediären Zustand der Erschöpfung (Z1). Die direkt (5 sec) nach dem Ende der Injektion registrierten Membranströme (Abb.26 A) zeigten die charakteristischen Veränderungen vollkommen erschöpfter Fasern: Die Membranströme waren vergrößert, die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters fehlte. Im dargestellten Beispiel erniedrigte sich der Eingangswiderstand bei einem Membranpotential von -55 mV von 417 auf 192 kΩ, was etwa einer 5-fachen Erniedrigung des Membranwiderstandes entspricht. Die Leitfähigkeitsänderungen durch die Ca-EGTA-Injektion war nach einer Pause von 4 min weitgehend reversibel. Der verzögerte Gleichrichter konnte wieder aktiviert werden (Abb.26 B). Eine weitere Ca-EGTA-Injektion (Abb.26 C) führte zu noch größeren Leitfähigkeitserhöhungen und zu lang dauernden einwärtsgerichteten "tail"-Strömen. (Zum Problem der "tail"-Ströme siehe Kapitel 3.2.4.).

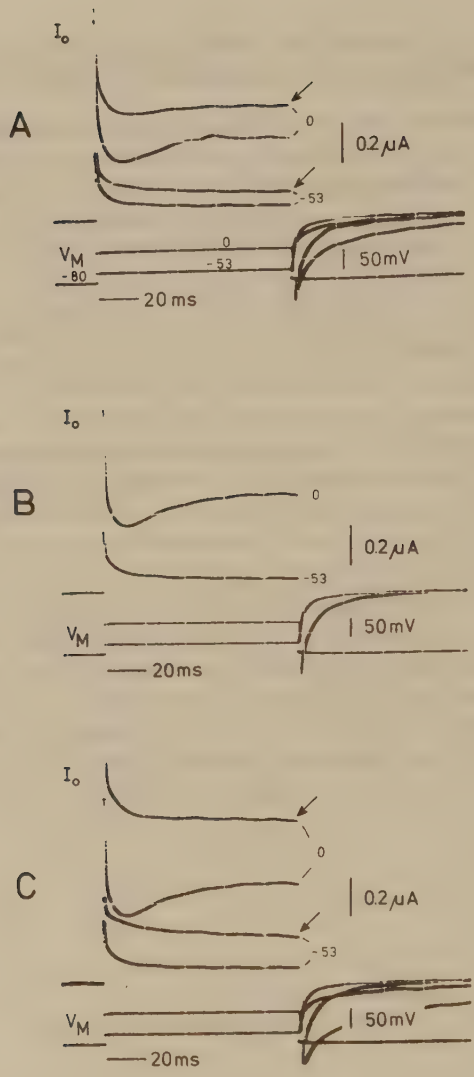

A
I_o
0
-53
0.2 µA
V_M
-80
0
-53
50 mV
20 ms
B
I_o
0
-53
0.2 µA
V_M
50 mV
20 ms
C
I_o
0
-53
0.2 µA
V_M
50 mV
20 ms

Abb. 26

Abb. 26

Ca-EGTA Injektion im intermediären Zustand der Erschöpfung (Z1)

A - C: I_o: Gesamtmembranstrom [µA]; V_M: Membranpotential [mV]; Zeitmaßstab: 20 ms; R.P.: -61 mV; H.P.: -80 mV; T: 10^o C; Normal-Ringerlösung plus Cyanid (4 mM) (Lsg. F; Kap. 2.2.); Injektionslösung N, Kap. 2.2.; TTX: 10^{-7} M. Ausgangszustand der Membranleitfähigkeit: Z1 (nach dem Ende der extrazellulären Reizung (M 2a, s. Kap. 2.5.).

A: Membranleitfähigkeitsänderung nach Ca-EGTA-Injektion

1.: I_o vor Ca-EGTA Injektion (Kontrolle) und 5 s nach Ca-EGTA Injektion (Pfeil). Membrandepolarisation auf -55 mV.

2.: I_o vor Ca-EGTA Injektion (Kontrolle) und 5 s nach Ca-EGTA Injektion (Pfeil). Membrandepolarisation auf -2.5 mV.

Direkter Übergang von Zustand Z1 in Zustand Z2 ohne intrazelluläre Reizung (M2b); große "tail"-Ströme.

B: Reversibilität des Ca-EGTA Effekts 4 min nach der Injektion

1.: I_o bei einer Membrandepolarisation auf -55 mV.

2.: I_o bei einer Membrandepolarisation auf -2.5 mV.

C: Erhöhung der Membranleitfähigkeit nach erneuter Ca-EGTA Injektion

1.: I_o vor (Kontrolle) und 3 s nach Ca-EGTA Injektion (Pfeil) Membrandepolarisation auf -55 mV.

2.: I_o vor (Kontrolle) und 3 s nach Ca-EGTA Injektion (Pfeil) Membrandepolarisation auf -2.5 mV.

Änderung der freien intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (s. Kap. 2.5.3.):

A: Es wurde eine Ausgangskonzentration von 10^{-7} M angenommen. Erhöhung durch Ca-EGTA Injektion auf $1.5 \cdot 10^{-6}$ M.

B: Erniedrigung (durch diffusionsbedingte Erniedrigung der Ca-EGTA Konzentration am Ort der Messung) auf $1.6 \cdot 10^{-7}$ M.

C: Erneute Erhöhung durch Ca-EGTA Injektion auf $1.4 \cdot 10^{-6}$ M.

3.2.3.3. Konzentrationsverteilung von Ca-EGTA und intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration nach Ca-EGTA Injektionen

Die Diffusionsprofile zu den in Abb. 26 beschriebenen Injektionsversuchen sind in Abb. 27 dargestellt. Der Berechnung dieser Verteilungskurven lagen die in Kap. 2.5.2. beschriebenen Annahmen zugrunde. Es wurde zweimal Ca-EGTA in dieselbe Faser injiziert. Zwischen beiden Injektionen lag eine Pause von 4 min.
Kurve 1 zeigt die Verteilung von Ca-EGTA nach dem Ende der ersten Injektion. Die Wirkung dieser Injektion ist in Abb. 26 A dargestellt. Die bewegte Gesamtladungsmenge betrug $17\,944 \cdot 10^{-9}$ As. Dies entspricht vermutlich einer Ca-EGTA Menge von 0.84 mM (Kap. 2.5.3.). Kurve 2 zeigt die veränderte Verteilung nach der Wartezeit von 4 min. Den Membranstromverlauf zu diesem Zeitpunkt zeigt Abb. 26 B.
Bei der zweiten Injektion wurde eine Gesamtladungsmenge von $10\,072 \cdot 10^{-9}$ As bewegt, wobei weitere 0.78 mMol Ca-EGTA appliziert wurden. Die Ca-EGTA Verteilung am Ende der zweiten Injektion zeigt Kurve 3, die Wirkung auf die Membranleitfähigkeit Abb. 26 C.

Für einen Abstand r = 50 µm vom Ort der Injektion errechnet sich für die drei dargestellten Zeitpunkte, direkt nach der ersten Injektion, 4 min nach der ersten Injektion und zum Ende der zweiten Injektion eine mittlere Ca-EGTA Konzentration von 0.84 mM, 16.6 µM und 0.79 mM. Demzufolge sollte die freie intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration nach der ersten Injektion von ca. $1 \cdot 10^{-7}$ M auf ca. $1.5 \cdot 10^{-6}$ M steigen, in der anschließenden Erholungspause von 4 min auf $1.6 \cdot 10^{-7}$ M sinken und durch die erneute Injektion wieder auf $1.4 \cdot 10^{-6}$ M ansteigen.

Obwohl mit der zweiten Injektion etwas weniger Ca-EGTA injiziert wurde als während der ersten Injektion, war die Membranleitfähigkeitserhöhung nach der zweiten Injektion größer als nach der ersten Injektion. Die Ursache könnte ein etwas weniger rascher Diffusionsausgleich sein als nach dem angenommenen Diffusionsmodell (Kap. 2.5.2.), d.h. die intrazelluläre Ca-EGTA Konzentration zum Ende der zweiten Injektion könnte möglicherweise größer sein als berechnet, wenn von der ersten Injektion ein etwas größerer Anteil hinzugerechnet werden müßte als angenommen.

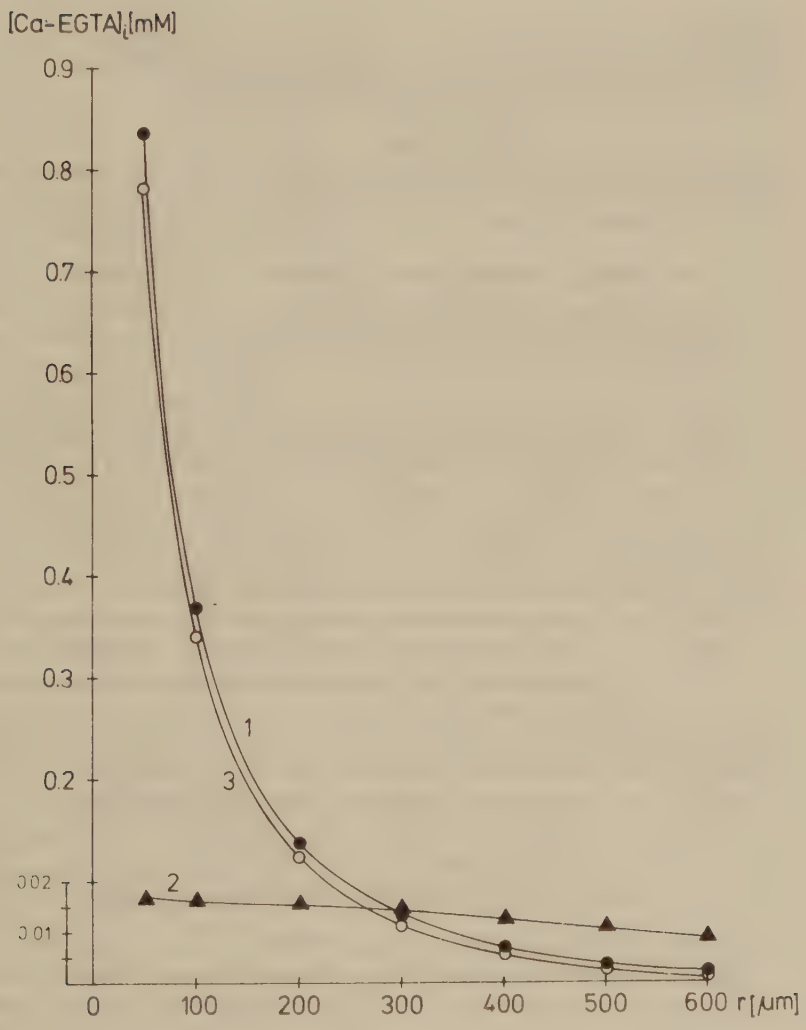

[Ca-EGTA]$_i$[mM]
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.02
0.01
1
2
3
0
100
200
300
400
500
600 r[µm]

Abb. 27

Abb. 27
Intrazelluläre Konzentrationsverteilung von Ca-EGTA - Diffusionsprofile von zwei Ca-EGTA Injektionen

Abszisse: Abstand r [µm] vom Ort der Injektion.
Ordinate: Intrazelluläre Ca-EGTA Konzentration [mM].
Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 2, Kap. 2.5.2.:

$$[\text{Ca-EGTA}]_i = \frac{q}{4 \cdot \pi \cdot D \cdot r} \cdot \text{erfc} \quad \frac{r}{2\sqrt{D \cdot t}}$$

q: pro Zeiteinheit injizierte Stoffmenge [Mol s^{-1}]
D: Diffusionskoeffizient [$cm^2 s^{-1}$]

Kurve 1 (○): Konzentrationsverteilung einer Ca-EGTA Injektion direkt nach Ende der Injektion. t: 144 s; M: $39.05 \cdot 10^{-12}$ Mol; D: $4.6 \cdot 10^{-6}$ cm^2 s^{-1}; q: $2.71 \cdot 10^{-13}$ Mol s^{-1}.
Die Wirkung dieser Injektion zeigt Abb. 26 A.

Kurve 2 (▲): Konzentrationsverteilung der in Kurve 1 dargestellten Injektion 4 min nach Ende der Injektion. Die Membranströme zu diesem Zeitpunkt zeigt Abb. 26 B. Für Kurve 2 gilt der gestreckte Ordinatenmaßstab links unten!

Kurve 3 (●): Konzentrationsverteilung einer weiteren Ca-EGTA Injektion direkt nach Ende der Injektion. t: 119.6 s; M: $30.6 \cdot 10^{-12}$ Mol; D: $4.6 \cdot 10^{-6}$ cm^2 s^{-1}; q: $2.56 \cdot 10^{-13}$ Mol s^{-1}.
Die Wirkung dieser Injektion zeigt Abb. 26 C.

Die Berechnung der freien intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (vergl. Kap. 2.5.3.) ergab für r = 50 µm folgende Werte: Kurve 1: $1.45 \cdot 10^{-6}$ M; Kurve 2: $1.58 \cdot 10^{-7}$ M; Kurve 3: $1.38 \cdot 10^{-6}$ M.

3.2.4. Die Entstehung von "tail"-Strömen im intermediären Zustand der Erschöpfung

Eine weitere charakteristische Veränderung stellen die im Verlauf der Erschöpfung nach dem Abschalten eines Klemmpulses auftretenden "tail"-Ströme dar. Sie wurden von FINK (1978) an vollkommen erschöpften Fasern analysiert.

"Tail"-Ströme treten auch an normalen Fasern nach hyper- und depolarisierenden Klemmschritten auf. Wird eine Muskelfaser nach einem depolarisierenden Klemmschritt zum Zeitpunkt maximaler Aktivierung des verzögerten Gleichrichters auf das Ruhepotential repolarisiert, so fließt ein einwärtsgerichteter "tail"-Strom, da das Gleichgewichtspotential des verzögerten Gleichrichters ca. 10 - 15 mV positiver liegt als das Ruhepotential (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970a) und somit eine treibende Kraft für einen einwärtsgerichteten Membranstrom vorliegt. An normalen Fasern klingen die "tail"-Ströme jedoch sehr schnell ab, da die K^+-Kanäle des verzögerten Gleichrichters bei Repolarisation auf -90 mV potentialabhängig schnell in den geschlossenen, deaktivierten Zustand übergehen. Wird die Membran einige hundert Millisekunden lang depolarisiert, so verschiebt sich das Gleichgewichtspotential in positiver Richtung (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970 a). Diese Verschiebung läßt sich mit einer Erhöhung der K^+-Konzentration in Membrannähe erklären. Dabei spielen nach den Berechnungen von ADRIAN, CHANDLER und HODGKIN (1970 a) Konzentrationsänderungen im T-System eine untergeordnete Rolle, da nach Ansicht der Autoren über die Membran des T-Systems nur geringe Anteile des Gesamt-Kaliumstromes durch den verzögerten Gleichrichter fließen.

An erschöpften Skelettmuskelfasern wurden langandauernde einwärts- und auswärtsgerichtete "tail"-Ströme beobachtet. Einwärtsgerichtete "tail"-Ströme sind bei erschöpften Fasern größer und länger andauernd als auswärtsgerichtete; sie nehmen mit zunehmender Dauer der depolarisierenden Klemmpulse zu und erreichen ein Maximum nach einigen hundert Millisekunden (FINK, 1978). Zwei Argumente sprechen dafür, daß es sich bei diesen Strömen

um Kaliumströme handelt: Sie treten auch in chloridfreien Lösungen auf. Sie verschwinden, wenn die extrazelluläre Kaliumkonzentration stark erhöht wird (80 mM). Dies ist zu erwarten, da die relativen Kaliumkonzentrationsänderungen in Membrannähe gegenüber dem übrigen Extrazellulärraum bei hoher K^+-Außenkonzentration vernachlässigbar klein werden.
Das Auftreten der "tail"-Ströme während der intrazellulären Reizung (M 26), ausgehend vom intermediaren Zustand (Z1), dargestellt in Abb. 28, kann ebenfalls am einfachsten mit Konzentrationsverschiebungen im membrannahen Extrazellulärraum erklärt werden. Durch die wiederholte Aktivierung des verzögerten Gleichrichters könnte es zu einer Anreicherung von K-Ionen kommen. Das Abklingen der "tail"-Ströme würde in diesem Fall die Rückkehr zur ursprünglichen K^+-Konzentration reflektieren. Nach Coffeinzugabe oder Ca-EGTA Injektionen (vgl. Abb. 25 und 26) traten jedoch große "tail"-Ströme bereits nach einmaliger Aktivierung des verzögerten Gleichrichters auf. Es erscheint wenig wahrscheinlich, daß die kurzzeitig fließenden Membranströme wesentliche Änderungen der extrazellulären K^+-Konzentration hervorrufen könnten. Denkbar ist aber, daß in diesen Experimenten die aktivierten Kanäle nach Repolarisation der Membran nicht potential-abhängig deaktivierten, sondern geöffnet blieben. Das Abklingen der einwärtsgerichteten "tail"-Ströme würde dann aber eine Erniedrigung der K^+-Konzentration in Membrannähe reflektieren. Die Ruheleitfähigkeit der Membran würde erhöht. Vorstellbar ist auch, daß die Deaktivierung der Kanäle verzögert ist
Die Ausbildung von "tail"-Srömen war reversibel (vgl. Abb. 22 A).

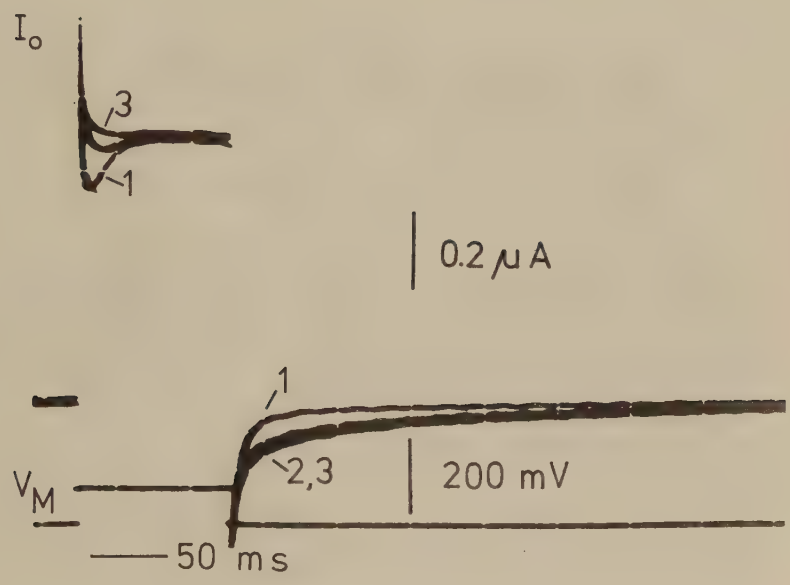


Abb. 28
Ausbildung von "tail"-Strömen während intrazellulärer Reizung

I_o: Gesamt-Membranstrom [µA]

V_M: Membranpotential [mV]

1.: Membranstrom I_o, 3 min nach extrazellulärer Reizung (M2a)
2.: I_o nach 10 Pulsen (Frequenz: 1 s^{-1}) durch intrazelluläre Reizung (M2b)
3.: I_o nach 20 Pulsen

Membrandepolarisation auf + 15 mV
R.P.: -67 mV; H.P.: -80 mV; T: 10^{o} C;
Normal-Ringer plus Cyanid (Lsg. F, Kap. 2.2.); TTX: 10^{-7} M.

4. Diskussion

4.1. Extra- und intrazelluläre Wirkung von Aminopyridinen und Tetraethylammonium auf die Kaliumleitfähigkeit normaler Skelettmuskelfasern

4.1.1. Die intrazelluläre Wirkung von 4-Aminopyridin und TEA auf den verzögerten Gleichrichter

Die Übereinstimmung in der Wirkung von 4-AP und TEA nach intrazellulärer Zugabe besteht darin, daß sich die Blockierung des verzögerten Gleichrichters durch 4-AP als auch die durch TEA gut mit einem kinetischen Reaktionsmodell vereinbaren läßt, welches eine 1 : 1-Reaktion der Blockermoleküle mit dem Kaliumkanal beschreibt (vgl. Kap. 3.1.5.1., Gl. 7). Dabei wird vorausgesetzt, daß nur offene Kanäle blockiert werden können und die Aktivierungskinetik des Öffnens der Kanäle unbeeinflußt bleiben. Nach einer 4-AP Injektion war die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters offensichtlich unverändert (s. Abb. 11). Sie wurde jedoch durch die Injektion von TEA deutlich verlangsamt (s. Abb. 17).

Dieser Unterschied in der Blockierung des verzögerten Gleichrichters durch 4-AP und TEA läßt sich jedoch mit Hilfe der verwendeten Reaktionsgleichungen erklären: Wie durch Umformung aus Gl. 6, Kap. 3.1.5.1 zu ersehen ist, verhält sich die Zeitkonstante τ der Blockierungsreaktion umgekehrt proportional der Konzentration an TEA bzw. 4-AP (B).

$$\tau = \frac{}{k_+ \cdot B + k_-} \text{ [s]} \qquad (1)$$

Dies bedeutet, daß mit zunehmender Konzentration an Blockermolekülen die Blockierungsreaktion schneller verläuft. Es läßt sich somit eine Geschwindigkeitskonstante k_+ für den Übergang vom offenen zum blockierten Kanal definieren: offener Kanal $\xrightarrow{k_+}$ blockierter Kanal.

Für k' gilt:

$$k_1' = k_1 \cdot B \qquad (2)$$

Wird k_1' bei steigender Konzentration so groß wie die Hodgkin-Huxley Geschwindigkeitskonstante α_n für die Aktivierung der Kanäle des verzögerten Gleichrichters oder größer, so wird die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters stark verlangsamt. Auf Grund der hohen Zahl (Konzentration) an Blockermolekülen können mehr Kanäle pro Zeiteinheit blockiert werden als bei niedriger Blockerkonzentration. Wie den Dosis-Wirkungskurven für 4-AP und TEA zu entnehmen ist (Abb. 15 B und Abb. 18 B), muß die intrazelluläre Konzentration an TEA im Vergleich zu $[4\text{-AP}]_i$ 6-fach erhöht werden, um den gleichen Blockierungseffekt zu erreichen. Setzt man voraus, daß die Wanderung der Blockermoleküle zu den K^+-Kanälen im elektrischen Feld der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion des Blockermoleküls ist (quasi diffusionskontrollierte Reaktion), kann man annehmen, daß k_1 für 4-AP und TEA etwa gleich groß ist (etwa gleiche Ionenbeweglichkeit), Daraus folgt, daß k_1' für die TEA-Reaktion mit dem K^+-Kanal bei gleicher "steady-state" Blockierung etwa 6-fach größer ist als für die 4-AP Reaktion, k_1' also stärker in die Nähe von α_n rückt. Damit erklärt sich der Unterschied in der Blockierungscharakteristik allein als Folge der unterschiedlichen Blockerkonzentration, ohne daß ein anderer Reaktionsmechanismus vorausgesetzt werden muß. Ist k_1 für TEA und 4-AP gleich, dann folgt daraus, daß k_2 den eigentlichen Unterschied in der Wirksamkeit der Blockermoleküle reflektiert. k_2 ist ein Maß für die "Stärke" der Bindung zwischen Blockermolekül und Kanal. Die Bindung von TEA an den K^+-Kanal ist demnach 6-fach geringer als die von 4-AP.

Die Wirkungen von 4-AP und TEA auf den verzögerten Gleichrichter zeigen große Ähnlichkeit zu den Wirkungen von TEA und TEA-Derivaten, die von ARMSTRONG & BINSTOCK (1965) und ARMSTRONG (1966, 1969, 1971) am 'late channel' des Riesenaxons des Tintenfisches

untersucht wurden. Der 'late channel' des Riesenaxons ist dem verzögerten Gleichrichter der Skelettmuskelfaser analog. ARMSTRONG (1966) nahm ebenfalls eine 1 : 1-Reaktionskinetik zwischen Blockermolekülen und dem K^+-Kanal an. Das kinetische Modell beinhaltete daneben die Hodgkin-Huxley-Kinetik für die Beschreibung der normalen Aktivierung des K^+-Kanals:

H.-H.-Kinetik

$$\underline{\text{Geschlossener}}\ \underline{\text{Kanal}} \underset{\beta_n}{\overset{\alpha_n}{\rightleftharpoons}} \underline{\text{Offener}}\ \underline{\text{Kanal}} \underset{k_2}{\overset{k_1'}{\rightleftharpoons}} \underline{\text{Blockierter}}\ \underline{\text{Kanal}}$$

Unter der Annahme, daß durch TEA und TEA-Derivate die normale Aktivierung nicht beeinflußt wird und TEA erst nach dem Öffnen des Kanals an den Bindungsort gelangt, konnte ARMSTRONG (1969) die Veränderungen der Membranströme durch verschiedene quartenäre Ammoniumverbindungen simulieren. Abb. 29 zeigt, wie der Verlauf der Membranströme durch entsprechende Wahl der Geschwindigkeitskonstanten k_1' und k_2 variiert werden kann. Es sollen hier nur drei Kurvenverläufe gezeigt werden. Neben der normalen Aktivierung (Kontrolle, Kurve A) mit $k_1' = k_2 = 0$ ist die Situation der blockierenden Wirkung des n-pentyltriethyl-ammonium-ions (C_5, Kurve B) und des methyltriethylammonium-ions (Kurve C) dargestellt. Kurve B entspricht dem charakteristischen Kurvenverlauf der 4-AP-Blockierung am Skelettmuskel (vgl. Abb. 11). Kurve C ist vergleichbar der TEA-Wirkung am Skelettmuskel (vgl. Abb. 16). ARMSTRONG (1969) stellte fest, daß für die beiden Blockermoleküle C_1 und C_5 die Geschwindigkeitskonstante k_1 der Bindungsreaktion im wesentlichen unverändert war, wie oben bereits für die Wirkung von 4-AP und TEA am Skelettmuskel angenommen wurde. Die Geschwindigkeitskonstante k_2 der Rückreaktion, welche die Stärke der Bindung des Blockermoleküls an den Kanal reflektiert, war dagegen wesentlich verändert. Die beiden Kurven B und C wurden so berechnet, daß sie zur gleichen "steady-

state" Blockierung führten, d.h. für beide Kurven ist der Quotient $\frac{k_4 \cdot c}{k_2}$ gleich (vgl. Gl. 10, Kap. 3.1.5.1.). Um die Blockierung von C_1 simulieren zu können (Kurve C), mußte k_2 20-fach erhöht werden. Die gleiche "steady-state" Blockierung kann dann nur erreicht werden, wenn die Konzentration an C_1 im Vergleich zur Konzentration an C_5 ebenfalls 20-fach erhöht wird. Da für die Simulation für α_n ein Wert von 3.1 ms^{-1} eingesetzt wurde, lag k' mit 16 ms^{-1} ca. 5-fach höher. Nach diesem Modell löst sich C_1 also sehr viel leichter von seiner Bindungsstelle als C_5, blockiert den Kalium-Kanal bei gleicher Konzentration also weniger stark als C_5. Für Kurve B war k' vierfach kleiner als α_n.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur blockierenden Wirkung von 4-AP und TEA am Skelettmuskel lassen sich gut in das Armstrong'sche Modell integrieren. TEA verhält sich demnach im Vergleich zu 4-AP am Skelettmuskel ähnlich wie am Riesenaxon im Vergleich zu C_5. In beiden Fällen zeigt es die schwächere Bindung an den K^+-Kanal und im Experiment den nach dem kinetischen Modell zu erwartenden Kurvenverlauf.

Ein wichtiger Unterschied zwischen der intrazellulären Wirkung von TEA und TEA-Derivaten an Nervenfasern und der intrazellulären Wirkung von 4-AP und TEA am Skelettmuskel betrifft die Reversibilität der Blockierung. Am Riesenaxon des Tintenfisches kann die Blockierung des "late-channel" durch Repolarisation oder Hyperpolarisation von der Membran wieder aufgehoben werden. Die Zeitkonstante der Erholung von der Blockierung hängt vom Blockermolekül, dem Membranpotential und der extrazellulären K^+-Konzentration ab und liegt zwischen 2 und 250 ms (ARMSTRONG, 1971). Im Gegensatz dazu war die Blockierung des verzögerten Gleichrichters der Skelettmuskelfasern durch 4-AP und TEA auch nach vielen Minuten nach Repolarisation oder Hyperpolarisation nicht wieder aufhebbar. Der Grund für diesen Unterschied könnte eine im Vergleich zur Nervenfaser stärkere Bindung der Blockermoleküle an den K^+-Kanal der Muskelfaser sein, d.h. k_2 müßte

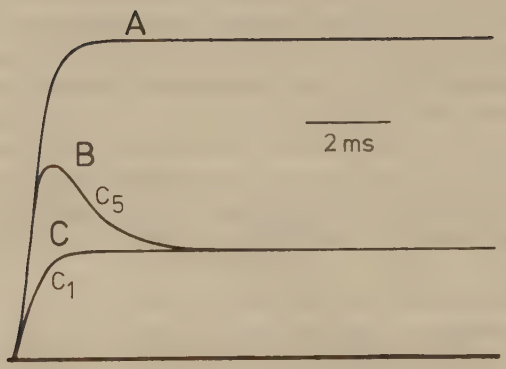


Abb. 29

Simulation des Membranstromverlaufs nach C_1 und C_5-Injektion am Riesenaxon des Tintenfisches durch Variierung der Geschwindigkeitskonstanten k'_1 und k_2 (verändert nach ARMSTRONG 1969)

Kurve A: Kontrolle; $K'_1 = K_2 = 0$

Kurve B: Membranstromverlauf nach Injektion von C_5 (n-pentyltriethylammonium-Ion); $k'_1 = 0.8\ ms^{-1}$, $k_2 = 0.4\ ms^{-1}$, $\frac{k'_1}{k_2} = 2$

Kurve C: Membranstromverlauf nach Injektion von C_1 (methyltriethylammonium-Ion); $k'_1 = 16\ ms^{-1}$, $k_2 = 8\ ms^{-1}$, $\frac{k'_1}{k_2} = 2$, d. h. gleiche "steady-state"-Blockierung wie in Kurve B.

$\alpha_n = 3.1\ ms^{-1}$, $\beta_n = 0$ für alle Kurven

kleiner sein als am Riesenaxon. Denkbar wäre aber auch, daß bei der Repolarisation der Membran die Kanäle schneller schließen, als sich die Blockermoleküle von ihren Bindungsstellen lösen, die Blockermoleküle also im Kanal gefangen werden. Diese Hypothese setzt voraus, daß Kanäle in den geschlossenen Zustand übergehen können, obwohl sie mit einem Blockermolekül besetzt sind. Versuche von ARMSTRONG (1971, 1975b) lassen darauf schließen, daß Kanäle des "late-channel" des Riesenaxons unter bestimmten Bedingungen, wenn auch verlangsamt, in einen geschlossenen und gleichzeitig blockierten Zustand übergehen können.

Der Vergleich der Wirkungen von Aminopyridinen am Riesenaxon des Tintenfisches und am Skelettmuskel bestätigt ebenfalls die Annahme, daß die Blockierung des "late-channel" durch die genannten Blocker weniger effektiv ist als am verzögerten Gleichrichter der Skelettmuskelfaser.
Die Untersuchungen zur Wirkung von Aminopyridinen am Riesenaxon des Tintenfisches (MEVES & PICHON, 1977; YEH, OXFORD, WU & NARAHASHI, 1976a, b) als auch Experimente am Ranvier'schen Schnürring (ULBRICHT & WAGNER, 1976) zeigten große Ähnlichkeit der Effekte:

1) Aminopyridine führen zu einer deutlichen Verzögerung der Aktivierungsphase des "late-channel".

2) Die Blockierung nimmt ab mit zunehmender Membrandepolarisation, zunehmender Dauer des Depolarisationsschrittes und mit zunehmender Frequenz von wiederholten depolarisierenden Klemmschritten.
MEVES & PICHON (1977) erklärten die verlangsamte Aktivierung des "late-channel" mit einer kontinuierlichen Lösung der Bindung von 4-AP Molekülen von ihren Bindungsstellen im Kanal im Verlauf eines Depolarisationsschrittes. Sie beobachteten bei wiederholter Aktivierung des "late-channels" ($2s^{-1}$) eine Normalisierung des Aktivierungsverlaufes, die sie mit der Annahme erklärten, daß die während eines Depolarisationsschrittes gelöste Bindung nur

langsam wieder geknüpft wird. MEVES und PICHON (1977) diskutierten die Möglichkeit, daß sich die Dissoziationskonstante K_D während einer Membrandepolarisation erhöht. YEH et al. (1976a u. b) schlugen vor, daß Aminopyridine an geschlossene Kanäle gebunden werden und von offenen Kanälen spannungsabhängig freigesetzt werden. Allerdings bleibt unklar, wie man sich die Freisetzung vorzustellen hat. ULBRICHT und WAGNER (1976) halten es für wenig wahrscheinlich, daß 4-AP Moleküle durch den Kanal hindurchgehen können und dabei das Selektivitätsfilter passieren, von dem angenommen wird, daß es nur etwa 3.0 - 3.3 Å weit ist (HILLE, 1973).

Der Grund für die Unterschiede in der blockierenden Wirkung von quarternären Ammoniumverbindungen und Aminopyridinen an Nerven- und Muskelfasern könnte in der unterschiedlichen Kanalstruktur der verschiedenen Präparate liegen. Dieses erscheint nicht unbegründet, da selbst die K^+-Kanäle an ein und demselben Präparat große Unterschiede in der Kalium-Selektivität zeigen. Der verzögerte Gleichrichter der Skelettmuskelfaser hat z. B. eine etwa 3-fach geringere K^+-Selektivität als der hochselektive Einwärtsgleichrichter am gleichen Präparat (s. Kap. 1.1.1.). Diese Selektivitätsunterschiede müssen eine strukturelle Ursache haben. Das Selektivitätsfilter könnte mehr oder weniger gut an das dehydratisierte K^+-Ion angepaßt sein oder die Pore könnte unterschiedliche Länge aufweisen (ARMSTRONG, 1975a; HILLE, 1975).

4.1.2. Die extrazelluläre Wirkung von Aminopyridinen und TEA auf die Membranleitfähigkeit der Skelettmuskelfaser

Die Versuche mit extrazellulär zugegebenem 4-AP ließen vermuten, daß 4-AP möglicherweise nur von der Innenseite der Membran wirkt. Die maximale Wirkung trat erst nach ca. 15 min ein, zu einem Zeitpunkt, zu dem der Diffusionsausgleich mit der Badlösung auch in unzugänglichen extrazellulären Spalträumen der Muskelfaser (T-System) längst beendet sein sollte (s. z. B. ENDO, 1966). Ähnliche Ergebnisse erzielten GILLESPIE und HUTTER (1975). Die Verzögerung des Wirkungseintritts kann mit dem langsamen Übertritt der Blockermoleküle über die Membran erklärt werden. Bei normalem physiologischen pH (7.2) liegt 4-AP zum größten Teil als Kation vor (pK: 9.17) und nur ein kleiner Prozentsatz ist ungeladen. Nimmt man an, daß nur ungeladene Moleküle die Membran passieren können, könnte die wirksame intrazelluläre 4-AP Konzentration erst nach längerer Inkubationszeit erreicht werden. Bei höherem pH-Wert müßte nach dieser Vorstellung der Eintritt der Blockierung beschleunigt sein, da der Anteil ungeladener Moleküle größer ist. GILLESPIE und HUTTER (1975) beobachteten bei einem pH-Wert von 9.8 eine beschleunigte Inaktivierung des verzögerten Gleichrichters, einen schnelleren Wirkungseintritt sowie eine stärkere Blockierung. Eigene Versuche zeigten jedoch keine sichere Beschleunigung des Wirkungseintritts. Allerdings wurde dieses Problem nicht im einzelnen untersucht, auch entsprachen die Versuchsbedingungen nicht denen der genannten Autoren.

Trotz des erwähnten Hinweises auf die Möglichkeit der intrazellulären Wirkung von 4-AP nach extrazellulärer Zugabe, nimmt GILLESPIE (1977) auch einen extrazellulären Wirkungsort für 4-AP an. Er unterscheidet eine tonische spannungsunabhängige Komponente, die nur von der extrazellulären 4-AP Konzentration abhängt von einer phasischen potentialabhängigen Komponenten. Die Blockierung der K^+-Leitfähigkeit durch die phasische Komponente war um so ausgeprägter, je negativer das angelegte Membran-

potential war. Sie wurde sichtbar durch ein beschleunigtes Abklingen der einwärtsgerichteten "tail"-Ströme, die auftreten, wenn die Membran zum Zeitpunkt maximaler Aktivierung des verzögerten Gleichrichters repolarisiert oder hyperpolarisiert wird. Versucht man, diese Ergebnisse in das Modell des K^+-Kanals zu integrieren, so würde dies bedeuten, daß 4-AP Moleküle mit einwärtsgerichteten Strömen von außen in den geöffneten Kanal des verzögerten Gleichrichters gelangen. Bei stark negativen Membranpotentialen (genauere Angaben wurden von GILLESPIE, 1977, nicht gemacht) bleibt deshalb das Molekül in der Pore, weshalb eine nachfolgende Depolarisation zu einer Blockierung der Leitfähigkeit des verzögerten Gleichrichters führt.

Wurde die Repolarisation der Membran so lange verzögert, bis alle Kanäle des verzögerten Gleichrichters inaktiviert waren, zeigte sich bei einer erneuten Depolarisation keine Blockierung gegenüber der Kontrolle. GILLESPIE (1977) zog aus dieser Beobachtung den Schluß, daß 4-AP Moleküle,extrazellulär zugegeben, nur offene Kanäle blockieren können und das Inaktivierungs-Gate des K^+-Kanals des verzögerten Gleichrichters an der Außenseite der Membran liegt.

Die eigenen Versuche mit extrazellulär zugegebenem 4-AP lassen nicht erkennen, ob die beobachtete blockierende Wirkung auf einer extra- oder intrazellulären Wirkung beruht oder auf einer Kombination von beidem. Der Unterschied in der Blockierungscharakteristik zwischen extrazellulärer Zugabe und der Injektion von 4-AP ist dennoch deutlich. So zeigte sich nach extrazellulärer Zugabe nicht die beschleunigte Inaktivierung der Ströme, die bei intrazellulärer Injektion beobachtet wurde.
Die bei starken Membrandepolarisationen festzustellende Blockierungsaufhebung (MOLGO, 1978; s. auch Abb. 5) spricht für eine Blockierung auf extrazellulärem Wege: Durch stärkere Depolarisationen könnten 4-AP Moleküle wieder aus dem K^+-Kanal entfernt werden.
Für die Wirkung von 3-AP zeigte die Untersuchung der Halbwerts-

zeiten (s. Abb. 9) einen deutlichen Effekt auf den Aktivierungsverlauf des verzögerten Gleichrichters. MOLGO (1978) erklärt die von ihm beobachtete verzögerte Aktivierung nach 4-AP Zugabe mit einer langsamen, während der Dauer des depolarisierenden Klemmpulses kontinuierlichen Lösung der 4-AP Moleküle von ihren Bindungsstellen im K^+-Kanal. Trifft diese rein hypothetische Vorstellung zu, so würde damit die Annahme einer extrazellulären Wirkung von 4-AP unterstützt, da nach intrazellulärer Zugabe keine Blockierungsaufhebung im Verlauf eines voltage-clamp Pulses erfolgt, sondern eine Blockierungsverstärkung nach zunächst unbeeinflußter Aktivierungsphase (vgl. Abb. 11).

Nach extrazellulärer Zugabe von TEA ist ebenfalls ein verlangsamter Anstieg der Ströme des verzögerten Gleichrichters festzustellen (STANFIELD, 1970a). Eine starke Aktivierungsverzögerung wird auch durch extrazellulär zugegebene Zn-Ionen erreicht (STANFIELD, 1975). STANFIELD nimmt an, daß Zn-Ionen an das Aktivierungsgate binden. Dies erscheint möglich, da das kleine Zn-Ion mit einem Ionenradius von 0.74 Å das Selektivitätsfilter mit einem Durchmesser von ca. 3 Å passieren könnte. Auf Grund der Molekülgröße von TEA und 4-AP kann man nicht annehmen, daß TEA und 4-AP den Kaliumkanal passieren können. Für diese großen Moleküle könnte deshalb das Modell einer Blockierungsaufhebung während eines depolarisierenden Klemmschrittes eine Rolle spielen (MOLGO, 1978). Permanent blockierte Kanäle dürften nur zu einer Abnahme der steady-state Ströme führen, nicht aber zu einer Veränderung der Aktivierungskinetik. STANFIELD (1970a) vermutet am Skelettmuskel einen extrazellulären Rezeptor für TEA auf Grund des relativ raschen Wirkungseintritts (Halbwertszeit von 3 min, nach EDWARDS, RITCHIE & WILKIE, 1956) und auf Grund der Annahme, daß TEA für die Membran nicht permeabel ist (ARMSTRONG & BINSTOCK, 1965).

STANFIELD (1970a) bestimmte die Dissoziationskonstante für die TEA-Wirkung nach extrazellulärer Zugabe mit $8 \cdot 10^{-3}$ M. Der in dieser Arbeit ermittelte Wert für K_D liegt mit $6.7 \cdot 10^{-5}$ M ca. 120-fach niedriger. Auch dieser große Unterschied könnte ein Hinweis für zwei verschiedene TEA-Rezeptoren sein.

Die unterschiedlichen intra- und extrazellulären Wirkungen von TEA am myelinierten Nerven des Frosches geben deutlichere Hinweise auf die Existenz zweier verschiedener Bindungsstellen für TEA an der Innen- und Außenseite des K^+-Kanals. Die intrazellulären Wirkungen von TEA und TEA-Derivaten sind denen am Riesenaxon des Tintenfisches sehr ähnlich (ARMSTRONG & HILLE, 1972). Die Blockierung durch extrazellulär zugegebenes TEA ist zeit- und spannungsunabhängig. Sie setzt sehr schnell, innerhalb von 40 ms ein (VIERHAUS & ULBRICHT, 1971) und ist unabhängig von der Inkubationsdauer innerhalb von 5 s reversibel (HILLE, 1970). HILLE (1967) bestimmte für die TEA-Wirkung nach extrazellulärer Zugabe am Ranvier'schen Schnürring eine Dissoziationskonstante von $4 \cdot 10^{-4}$M.

Die bislang bekannten Ergebnisse zur Blockierung der verzögerten Gleichrichtung durch extrazelluläre Zugabe von Aminopyridinen (und auch für TEA) an der Skelettmuskelfaser lassen also keine eindeutigen Aussagen über den Wirkungsmechanismus zu. Wahrscheinlich erscheint, daß zwei Bindungsstellen existieren, von denen eine mehr zur Innenseite, die andere mehr zur Außenseite des K^+-Kanals zu lokalisieren ist, getrennt durch das Selektivitätsfilter. Eine intrazelluläre Bindungsstelle muß auf Grund der Ergebnisse aus den Injektionsexperimenten vermutet werden. Für einen extrazellulären Wirkungsort sprechen die Ergebnisse von GILLESPIE, 1977.

4.2. Die hohe Membranleitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern

Es sollen im folgenden drei Fragestellungen diskutiert werden:

- Läßt sich die hohe K^+-Leitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern einer der drei an normalen Fasern beschriebenen Leitfähigkeitskomponenten zuordnen?
- Wird die Erhöhung der K^+-Leitfähigkeit erschöpfter Fasern durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration ausgelöst?
- Welche Rolle spielt bei der Leitfähigkeitserhöhung die Stoffwechselvergiftung und die während der Erschöpfungsprozedur eintretende Reduzierung der Stoffwechselenergie?

4.2.1. Die Membranleitfähigkeit vollkommen erschöpfter Muskelfasern (Z3)

Die Gesamt-Membranleitfähigkeit einer Muskelfaser steigt im Laufe der Erschöpfungsprozedur von 330 $\mu S/cm^2$ auf 17200 $\mu S/cm^2$, d. h. auf etwa das 50-fache (FINK & LÜTTGAU, 1976; FINK, 1978). Die Autoren stellten gleichzeitig eine Verschiebung des Leitfähigkeitsverhältnisses $G_K : G_{Cl}$ zugunsten der Kaliumleitfähigkeit von 2 : 3 (normale Faser) auf 5 : 1 (erschöpfte Faser) fest. Die K^+-Leitfähigkeit erhöhte sich dabei 100-fach, die Chloridleitfähigkeit 15-fach. Die Na^+:K^+ Selektivität der erschöpften Faser war leicht erhöht ($P_{Na^+} : P_{K^+} = 0{,}009$, statt 0,01 bei normalen Fasern). Entsprechend wurde im Verlauf der Erschöpfung eine Hyperpolarisation der ruhenden Membran beobachtet (vgl. Tab. I, Kap. 1.2.).

FINK und LÜTTGAU (1976), FINK (1978) und FINK und WETTWER (1978) nahmen an, daß der verzögerte Gleichrichter den Hauptteil zu der erhöhten K^+-Leitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern beiträgt. Für diese Ansicht sprachen folgende Befunde:

1) Die maximale Leitfähigkeit des verzögerten Gleichrichters (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970 a; STANFIELD, 1970 a, 1975; ALMERS, 1976) und die hohe Leitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern (FINK & LÜTTGAU, 1976; FINK, 1978) erreichen etwa gleiche Werte.

2) Beide Systeme sind durch eine lineare sofortige (instantaneous) Strom-Spannungskennlinie gekennzeichnet (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970; FINK, 1978).

3) 95 % der hohen K^+-Leitfähigkeit erschöpfter Muskelfasern sind durch TEA blockierbar (FINK, 1978). Dieser Wert entspricht der Blockierbarkeit des verzögerten Gleichrichters der normalen Faser durch TEA (STANFIELD, 1970 b).

Da die Leitfähigkeit erschöpfter Fasern jedoch keine Aktivierungs- und Inaktivierungsphasen durchläuft, sondern permanent aktiviert ist und bei Depolarisation sofort die maximale Leitfähigkeit zeigt, wurde die Vorstellung entwickelt, daß im erschöpften Zustand das "Aktivierungs-Gating" des verzögerten Gleichrichters modifiziert wird mit der Folge, daß die K^+-Kanäle in einem permanent offenen, potentialunabhängigen Zustand verharren (FINK & WETTWER, 1978).
Eine Beteiligung des Einwärtsgleichrichters bzw. der langsamen Komponente an der hohen K^+-Leitfähigkeit erschöpfter Fasern kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. So ist ein Teil der Membranleitfähigkeit erschöpfter Fasern durch Rb-Ionen blockierbar (FINK & LÜTTGAU, 1976). Es ist aber bekannt, daß der verzögerte Gleichrichter für Rb-Ionen gut permeabel ist (GAY & STANFIELD, 1978), während Ströme durch den Einwärtsgleichrichter durch Rb-Ionen gehemmt werden (ADRIAN, 1964). Eine wesentliche Beteiligung des Einwärtsgleichrichters an der hohen K^+-Leitfähigkeit würde aber voraussetzen, daß dieser seine einwärts gleichrichtenden Eigenschaften vollständig verliert.
Die langsame Komponente kann nicht durch Rb-Ionen (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970 b), Zn-Ionen (STANFIELD, 1975) und TEA

(STANFIELD, 1970 a) blockiert werden. Es erscheint deshalb nicht sehr wahrscheinlich, daß diese Komponente einen großen Anteil an der hohen Leitfähigkeit hat. Außerdem beträgt die maximale Leitfähigkeit der langsamen Komponente nur etwa 1/10 der Ruheleitfähigkeit der erschöpften Muskelfaser.
FINK (1978) hält es jedoch für möglich, daß die langsame Komponente an der nicht blockierbaren Gesamtleitfähigkeit der erschöpften Faser beteiligt ist. Für eine Beteiligung der langsamen Komponente spricht die Tatsache, daß auch sie durch eine lineare sofortige Strom-Spannungs-Kennlinie charakterisiert ist, und ihre K^+-Selektivität möglicherweise noch die des verzögerten Gleichrichters übertrifft (ADRIAN, CHANDLER & HODGKIN, 1970 b). In dieser Eigenschaft stimmt die langsame Komponente sogar besser mit dem Verhalten der erschöpften Membran überein als der verzögerte Gleichrichter.

Neben einer Beteiligung bekannter K^+-Kanäle an der hohen K^+-Leitfähigkeit muß die Möglichkeit der Neubildung von K^+-Kanälen in Betracht gezogen werden. Insbesondere die Membranstromverläufe während des Übergangs vom intermediären Zustand der Erschöpfung (Z1) zum Zustand Z2 durch intrazelluläre Reizung lassen sich nur schwer mit der Vorstellung einer Neubildung von Kanälen vereinbaren. Die Bildung von neuen Kanälen müßte zur Addierung der Stromkomponenten führen. Die Beobachtungen, besonders die Experimente mit lokaler intrazellulärer Erschöpfung (s. Abb. 19; Abb. 22 A und C) sprechen aber gegen diese Vorstellung, da sich die Gesamt-Membranströme in diesen Experimenten nicht wesentlich erhöhten. Man müßte die sehr unwahrscheinliche Annahme treffen, daß Aktivierung neugebildeter Kanäle und Inaktivierung vorhandener Kanäle so ineinandergreifen, daß die Gesamtleitfähigkeit der erschöpften Membran sich trotz der Verschiebung in den Anteilen der einzelnen Komponenten nicht verändert.

4.2.2. Die Membranleitfähigkeit im intermediären Zustand

Die von FINK und LÜTTGAU (1976) durch Cyanid- und Monojodazetat-Vergiftung und anschließende Erschöpfung erzielte hohe Membranleitfähigkeit war nicht reversibel. In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente vorgestellt, die aufgrund einer veränderten Erschöpfungsmethode (M2a, M2b, Kap. 2.3.) die Darstellung eines reversiblen Übergangs zwischen aktivierbaren ("normalen") und permanent offenen ("erschöpften") K^+-Kanälen gestatten. Durch Coffein-Zugabe oder EGTA- und Ca-EGTA Injektionen wurden unterschiedliche Veränderungen der Membranleitfähigkeit hervorgerufen, die im folgenden diskutiert werden sollen.

Betrachtet man ein typisches Erschöpfungsexperiment, bei dem ausgehend vom intermediären Zustand (Z1, Abb. 19 und 22 A) intrazellulär gereizt wurde, so ergibt sich ein verändertes Bild gegenüber dem vollkommen erschöpften Zustand (Z3, Abb. 1 B): Die Membranströme erhalten durch die fortgesetzte Reizung zwar die Form der Ströme, die auch an vollkommen erschöpften Fasern beobachtet wurden (permanent aktivierte Membranleitfähigkeit, "tail"-Ströme), aber im "steady-state" übersteigt die maximale erreichbare Stromamplitude nicht oder nur geringfügig die Kontrollwerte. Nach 30 Reizpulsen ist der Gesamt-Membranstrom I_o im "steady-state" immer noch niedriger als die Kontrolle (Abb. 19, Spur 2). Es erfolgt also keine Erniedrigung des Membraneingangswiderstandes, im Gegensatz zur Widerstandsabnahme, die an vollkommen erschöpften Fasern beobachtet wurde (FINK & LÜTTGAU, 1976). Diese scheinbare Diskrepanz läßt sich jedoch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Erschöpfungsmethoden erklären: Bei der extrazellulären Reizung, die z. B. FINK (1978) als Erschöpfungsmethode verwendete, kommt es zu einer Leitfähigkeitserhöhung, welche die gesamte Membranfläche der untersuchten Faser erfaßt. Im Punkt-voltage-clamp Experiment registriert man in diesem Falle eine Erniedrigung des Membran-Eingangswiderstandes und entsprechend eine Zunahme der Membranströme. Die spezifische maximale Leitfähigkeit (S/cm^2)

normaler und erschöpfter Fasern bleibt jedoch etwa unverändert. Die intrazelluläre Reizung dagegen wirkt nur auf einen eng begrenzten Teil der Fasermembran, denn nur die Bereiche in unmittelbarer Nähe der Spannungselektrode werden im voltage-clamp Experiment exakt kontrolliert. Die Membranfläche, die durch die intrazelluläre Erschöpfungsmethode (M2b) eine Leitfähigkeitserhöhung erfährt, ist im Verhältnis zur Gesamtfläche der Fasermembran sehr klein. Diese nur eng begrenzte Leitfähigkeitserhöhung könnte der Grund dafür sein, daß die Membraneingangsströme im "steady-state" nach intrazellulärer Reizung nicht wesentlich von den Kontrollströmen abweichen. Eine exakte Beschreibung des Potentialabfalls mit Hilfe der nichtlinearen Kabeltheorie ist jedoch sehr kompliziert und wurde hier nicht durchgeführt. Es müßte dabei berücksichtigt werden, daß bei lokaler Erschöpfung Bereiche mit unterschiedlicher Längenkonstante λ aneinandergrenzen.

Setzt man voraus, daß auch nach der Erschöpfungsprozedur (M2b) die gleiche Anzahl von Kanälen erfaßt wird, die auch im Kontrollexperiment aktiviert werden, so sollte bei einer Umwandlung vorhandener Kanäle keine Erhöhung der "steady-state"-Membranströme erfolgen. Komplizierter wird die Situation dadurch, daß als Folge der relativ hohen Reizfrequenz ($1 - 2\ s^{-1}$) neben der Aktivierung auch Inaktivierungsprozesse ablaufen (vgl. ALMERS, 1976), die besonders deutlich werden, wenn der Übergang zum erschöpften Zustand durch EGTA-Injektionen unterbunden wird (vgl. Abb. 22 B). In diesen Experimenten war eine nahezu vollständige Inaktivierung der Membranströme zu beobachten.

Abb. 30 soll anhand einer Originalaufzeichnung die Vorstellung des kontinuierlichen Übergangs zum offenen Zustand der Kanäle verdeutlichen, bei welchem zwischenzeitlich ein Teil der Kanäle einen inaktivierten Zustand einnimmt:

Nimmt man an, daß die anfängliche Leitfähigkeitszunahme, die in den ersten zehn Millisekunden gegenüber der Kontrolle sichtbar wird (Abb. 30 A, Spur 1), bis zum Ende des Klemmpulses konstant

bleibt, läßt sich die Gesamtheit der Kanäle, der Gesamtstrom I_o in drei Komponenten aufteilen:

1) In Kanäle, die in den permanent offenen Zustand umgewandelt sind (schraffierte Fläche b in Abb. 30);

2) in Kanäle, die inaktiviert sind (dieser Anteil wird erkennbar durch ein Defizit im Gesamtstrom, gekennzeichnet durch die Teilfläche a);

3) in Kanäle, die normal aktivierten (gekennzeichnet durch Teilfläche c).

Mit zunehmender Anzahl der Reizpulse nimmt der Anteil der inaktivierten und normal aktivierbaren Kanäle ab, bis, wie in Abb. 30 D, alle Kanäle in den permanent offenen Zustand übergegangen sind. Weitere Reizung bewirkt keine weitere Zunahme der Membranleitfähigkeit. (Abb. 30 D: Spur 4 wurde nach 50, 70 und 90 Reizpulsen aufgezeichnet). Die willkürlich angenommene "Null-Linie" des Membranstroms durch den Kanal des verzögerten Gleichrichters wurde in Abb. 30 A-D gestrichelt eingezeichnet.

4.2.3. Membranströme nach Coffeinzugabe und Ca-EGTA Injektionen

Unter der Einwirkung von Coffein ließ sich im Gegensatz zu dem in Abb. 30 dargestellten Erschöpfungsversuch ausgehend vom intermediären Zustand (Z1) eine deutliche Zunahme der Membranströme registrieren (Abb. 25 C). Die Annahme einer Umwandlung bereits existierender Kanäle wird durch dieses Experiment aber nicht entkräftet. Eine Zunahme des Gesamtstromes gegenüber der Kontrolle ist in diesem Fall zu erwarten, da Coffein nach extrazellulärer Zugabe die Membranleitfähigkeit der gesamten Faser beeinflußt. Eine Inaktivierung trat nicht auf, weil nicht repetitiv gereizt wurde. Demzufolge sollten auch "aktivierende" Anteile im Gesamtstrom zu sehen sein, die mit zunehmender Leitfähigkeitserhöhung, d. h. zunehmender Anzahl umgewandelter Kanäle abnehmen sollten. Im Experiment kann dieses Verhalten beobachtet werden (vgl. Abb. 25 C).

Auch nach Ca-EGTA Injektionen könnten durch Diffusion von injiziertem Ca-EGTA größere Bereiche der Faser in den erschöpften, d. h. hochleitfähigen Zustand (Z2) übergegangen sein. Tatsächlich waren die Membranströme nach Ca-EGTA Injektionen deutlich größer als die Kontrollwerte (Abb. 26 A, C). Der Einfluß von nicht umgewandelten Kanälen blieb jedoch auch in diesen Experimenten sichtbar.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Erschöpfungsexperimente ausgehend vom intermediären Zustand (Z1) sowie die Injektionsversuche mit EGTA und Ca-EGTA als auch die Coffeinversuche lassen sich demnach mit der bisherigen Vorstellung vereinbaren, nach der die vorhandenen Kalium-Kanäle, bevorzugt die des verzögerten Gleichrichters, bei Erschöpfung in ihrem maximal leitfähigen Zustand arretiert werden (FINK & WETTWER, 1978).

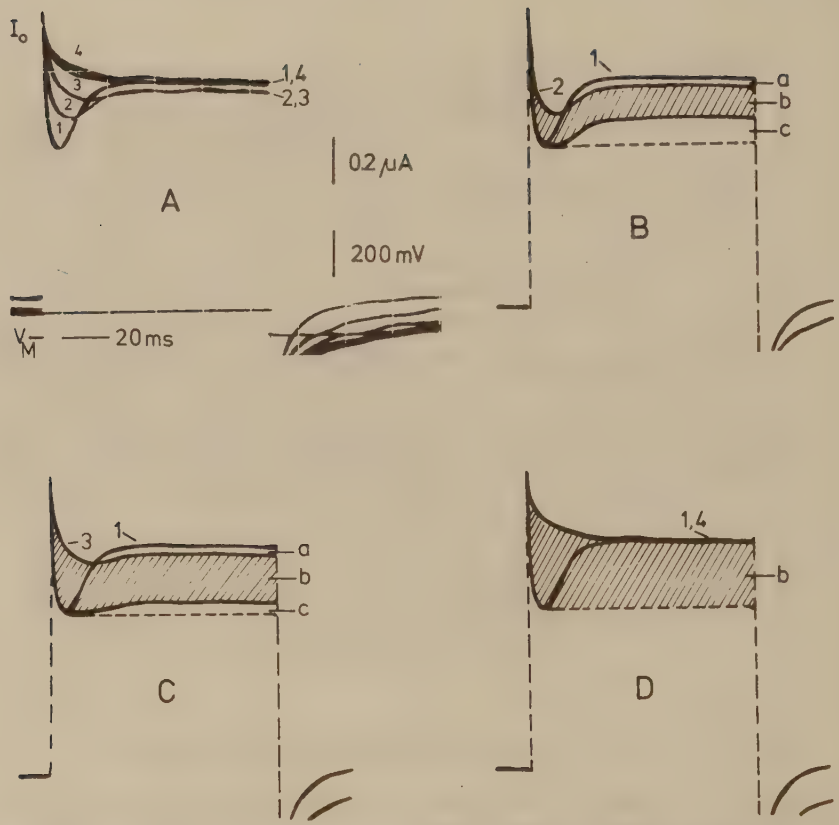


Abb. 30
Modellvorstellung zur Umwandlung von Kanälen des verzögerten Gleichrichters in einen Zustand permanent hoher Leitfähigkeit

Erschöpfungsversuch durch intrazelluläre Reizung (M2b).

A: entspricht Abb. 22 C.
1) Kontrolle, Membranstrom (I_o) vor intrazellulärer Reizung (nach M2a)
2) I_o nach 10 Reizpulsen
3) I_o nach 30 Reizpulsen
4) I_o nach 50, 70 und 90 Reizpulsen

B: Membranstromverlauf nach 10 Reizpulsen (2)
Aufteilung des Gesamtstroms I_o in drei Komponenten:
a) Anteil inaktivierter Kanäle (Defizit gegenüber der Kontrolle, Spur 1)
b) Anteil der in den permanent offenen Zustand umgewandelten Kanäle (schraffierte Fläche)
c) Anteil der normal aktivierten Kanäle

C: Membranstromverlauf nach 30 Reizpulsen (3)
Der Anteil der umgewandelten Kanäle in den offenen Zustand hat zugenommen (b)

D: Membranstromverlauf nach 50, 70 und 90 Reizpulsen
Alle Kanäle sind in den offenen Zustand übergegangen. Es erfolgt keine Leitfähigkeitserhöhung über die Kontrolle hinaus.

4.2.4. Ca^{2+}-induzierte K^+-Leitfähigkeit in Skelettmuskelfasern?

An normalen Skelettmuskelfasern konnte eine Ca^{2+}-induzierte K^+-Leitfähigkeitskomponente bislang nicht nachgewiesen werden. FINK (1975) erzielte mit $CaCl_2$ und Ca-EGTA Injektionen nur geringe Erniedrigungen des Membran-Eingangswiderstandes von maximal 10 %, die jedoch auch nicht mit Sicherheit auf die Wirkung von Kalzium zurückgeführt werden konnten. FINK (1975a) registrierte aber eine Abnahme des Eingangswiderstandes zwischen 10 und maximal 20 % nach der Zugabe von 1-2 mM Coffein. Zur Hemmung der Ca^{2+}-Pumpe des SR wurden die Versuche bei 0° C durchgeführt. Die Effekte waren am deutlichsten nach der Auslösung von Aktionspotentialen. Ähnlich geringe Widerstandserniedrigungen wurden von AXELSON und THESLEFF (1958) nach Zugabe von Coffein erzielt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche sprechen für die Existenz einer Ca^{2+}-induzierten Kaliumleitfähigkeitskomponente zumindestens in stoffwechselvergifteten und erschöpften Skelettmuskelfasern: Zum einen konnte an normalen Fasern mit der Verschiebung der Kontraktionsschwelle zu positiveren Membranpotentialen deutlich die Wirksamkeit von EGTA-Injektionen demonstriert werden. Andererseits konnte der Übergang zur permanent hohen Membranleitfähigkeit durch zwei verschiedene Methoden, durch Ca-EGTA Injektionen und durch Coffein-Zugabe, die beide eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) bewirken, ausgelöst werden. Darüberhinaus waren alle Effekte reversibel.

Die Versuche, die intrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationsänderungen zu quantifizieren, führten ebenfalls zu realistisch erscheinenden Größenordnungen. Aufgrund der in Kap. 2.5./2.5.3. vorgestellten Berechnungen konnte die $[Ca^{2+}]_i$ durch EGTA-Injektionen um den Faktor 18.5 erniedrigt werden (angenommene Ausgangskonzentration 10^{-7} M) und durch die Injektion von Ca-EGTA um den Faktor 14.5 erhöht werden, d. h. in einem Bereich von ca. $5 \cdot 10^{-9}$ bis $1{,}5 \cdot 10^{-6}$ M variiert werden. Die genannten Zahlen für die Änderung von $[Ca^{2+}]_i$ stellen natürlich nur eine Abschätzung dar. Die

Größenordnung erscheint aber realistisch. Nimmt man z.B. an, daß die wirklich injizierte Menge an EGTA bzw. Ca-EGTA 10fach kleiner war als die angenommene, so würde sich dadurch der Konzentrationsbereich,in dem $[Ca_i^{2+}]$ variiert werden konnte, auf ca. $3.7 \cdot 10^{-8}$ M bis $3.3 \cdot 10^{-7}$ M ändern. Wählt man eine kleinere Bindungskapazität für interne Ca^{2+}-Bindungsstellen von 0.1 mM statt 0.2 mM, so verändert sich der Bereich nur wenig auf Werte zwischen $5.2 \cdot 10^{-9}$ M und $2.4 \cdot 10^{-6}$ M. Erniedrigt man sowohl die angenommene Injektionsmenge auf 1/10 als auch die Bindungskapazität auf 0.1 mM, so kommt man zu Werten zwischen $4.8 \cdot 10^{-8}$ M und $5 \cdot 10^{-7}$ M.

4.2.5. Der Einfluß des Energiestoffwechsels auf die hohe Kaliumleitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern

Die Untersuchungen von HASE (1978) haben gezeigt, daß nach Stoffwechselvergiftung sowohl durch Cyanid und Monojodazetat als auch durch Dinitrofluorbenzol und anschließender Kontraktionserschöpfung der ATP-Gehalt der Muskelfasern um 80 % reduziert ist. Creatinphosphat (CP) konnte nach der Vergiftung durch Cyanid und Monojodazetat nicht mehr nachgewiesen werden. Nach der Vergiftung durch 2.4-DNFB war der CP-Gehalt unverändert. Damit wurde gezeigt, daß die Energiereduzierung unabhängig von dem verwendeten Stoffwechselgift war. Der Restgehalt an ATP bewahrte die Fasern zumindest für die Versuchsdauer (1 - 2 std.) vor dem Übergang in den Rigor-Zustand. Diese Versuche zeigen direkt, daß die Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit parallel zur Reduzierung der Energiereserven auftritt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente lassen eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration im Verlauf der Energiereduzierung vermuten, obwohl sie nicht direkt, etwa durch eine Farbstoffreaktion nachgewiesen wurde. Da im energiereduzierten Zustand (intermediärer Zustand Z1) durch die Änderung von $[Ca^{2+}]_i$ (durch Coffein, Ca-EGTA und EGTA) die Membranleitfähigkeit verändert werden kann, ist außerdem

wahrscheinlich, daß die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ neben der Erniedrigung der ATP-Reserven eine wesentliche Ursache für die Kaliumleitfähigkeitserhöhung darstellt.
Allerdings wird zum einen bei normalen Fasern trotz enormer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ während der Kontraktionsaktivierung keine K^+-Leitfähigkeitserhöhung sichtbar (vgl. Abb. 20). Zum anderen müßte, wenn die Berechnungen für $[Ca^{2+}]_i$ zutreffen (Kap. 2.5.3.), auch im erschöpften Zustand nach einer Ca-EGTA Injektion und der daraus folgenden $[Ca^{2+}]_i$-Erhöhung auf ca. 10^{-6} M eine nahezu maximale Kontraktionsaktivierung erfolgen (LÜTTGAU & MOISESCU, 1978). Diese wurden jedoch nicht beobachtet. Daraus folgt, daß entweder die berechneten $[Ca^{2+}]_i$-Veränderungen kleiner sind oder die Kontraktionsaktivierung bei erschöpften Fasern gestört ist. Setzt man voraus, daß die Ca^{2+}-induzierte K^+-Leitfähigkeit auch in normalen Fasern potentiell vorhanden ist, muß man annehmen, daß das K^+-Leitfähigkeitssystem im erschöpften Zustand gegenüber Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ empfindlicher wird.

Die hier vorgestellten Experimente gestatten keinen Einblick in die Wechselbeziehung zwischen ATP-Verarmung, $[Ca^{2+}]_i$ und K^+-Leitfähigkeit. Es lassen sich jedoch interessante Parallelen ziehen zwischen der hohen K^+-Leitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern und ähnlichen Vorgängen, die an Erythrozyten beschrieben worden sind. Die Untersuchungen an Erythrozyten-Membranen könnten Denkanstöße für die Erklärung der Vorgänge an Skelettmuskelfasern liefern und sollen deshalb im folgenden beschrieben werden.

4.2.6. Ca^{2+}-induzierte K^+-Leitfähigkeitserhöhung an Erythrozyten: Ein Modell für die hohe K^+-Leitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern

Normale Erythrozyten halten mit Hilfe einer Ca^{2+}-Pumpe, die mit einer membrangebundenen Ca-Mg-ATPase assoziiert ist, eine sehr niedrige intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration aufrecht ($< 10^{-6}$ M). Bei Entzug der Stoffwechselenergie tritt eine rasche Erhöhung der Ca_i^{2+}-Konzentration ein. Sie ist begleitet von einer drastischen Erhöhung der K^+-Leitfähigkeit. In ATP-verarmten Erythrozyten ist die Empfindlichkeit der K^+-Leitfähigkeit für Änderungen der Ca^{2+}-Konzentration um 2-3 Größenordnungen erhöht (LEW & FERREIRA, 1976). Die Autoren konnten aber zeigen, daß sich auch an nicht ATP-verarmten Erythrozyten eine Erhöhung der K^+-Leitfähigkeit und eine hohe Ca^{2+}-Empfindlichkeit der K^+-Leitfähigkeit induzieren läßt, wenn der Zelle durch Verwendung der Ca^{2+}-Ionophore A 23187 trotz aktiver Ca^{2+}-Pumpe eine hohe intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration aufgezwungen wird. Es stellt sich somit die Frage, welche Rolle die ATP-Verarmung bei der Induzierung der hohen K^+-Leitfähigkeit einnimmt und wie durch eine Erhöhung von Ca_i^{2+} eine K^+-Leitfähigkeitserhöhung ausgelöst wird.
LEW und FERREIRA (1978) halten es für möglich, daß Ca^{2+} "membranwirksame" Enzyme aktivieren kann, so z.B. Membran-Phospholipasen. Diese Vorstellung gründet sich auf Experimente von ALLAN und MICHELI (1975), die in menschlichen Erythrozyten bei Erhöhung von Ca_i^{2+} eine Anhäufung von 1,2-Diacylglycerin (DAG) feststellten. LEW und FERREIRA (1976) schlugen deshalb vor, daß eine Anhäufung von DAG oder anderer Ca^{2+}-abhängiger Stoffwechselprodukte eine Aktivierung des K^+-Kanals hervorrufen könnte. Eine Wirkungsverstärkung könnte dadurch zustande kommen, daß die ATP-abhängige Umwandlung des DAG in ein membranunwirksames Phosphatid aufgrund des ATP-Mangels verhindert oder verlangsamt wird. In diesem Zusammenhang sind Befunde von HINZEN und TAUC (1977) erwähnenswert, nach denen Injektionen von Phospholipasen in Aplysia-Neurone zu starken Hyperpolarisationen und Erniedrigungen des Membranwider-

standes führten. ALLAN und MICHELL (1977) zeigten allerdings später, daß kein direkter Zusammenhang zwischen der Anhäufung von DAG und der K^+-Leitfähigkeitserhöhung besteht. Trotzdem bleibt der grundlegende Gedanke dieses Modells, die durch Ca_i^{2+}-Erhöhung und ATP-Verarmung hervorgerufene Anhäufung eines Stoffwechselproduktes, welche die Aktivierung der K^+-Leitfähigkeit auslöst, weiterhin sehr hilfreich für die Erklärung der hohen K^+-Leitfähigkeit erschöpfter Skelettmuskelfasern. Mit dieser Vorstellung läßt sich nämlich erklären, warum es bei der Kontraktionsaktivierung in normalen Muskelfasern trotz Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration nicht zu einer K^+-Leitfähigkeitserhöhung kommt.

Inzwischen wurden in Erythrozyten Ca^{2+}-abhängige Regulationsvorgänge entdeckt, die möglicherweise mit der Ca^{2+}-induzierten K^+-Leitfähigkeitserhöhung verknüpft sind (LEW et al. 1980).

Ein Beispiel stellt die membrangebundene Ca-Mg-ATPase der Erythrozytenmembran dar. Die Aktivität dieses Enzyms wird durch das im Plasma gelöste Ca-Regulatorprotein, das Calmodulin, beeinflußt. Calmodulin wird in jüngster Zeit in zunehmendem Maße als universelles Ca-Regulatorprotein lebender Zellen erkannt (CHEUNG, 1978, 1980). Es verfügt über vier Bindungsstellen für die zweiwertigen Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+} mit unterschiedlicher Affinität dieser Bindungsstellen für die Ionen. Die Regulatorfunktion ist abhängig von der Besetzung dieser Bindungsstellen mit Mg^{2+} oder Ca^{2+} und deshalb abhängig von der intrazellulären Magnesium- und Kalzium-Konzentration. Änderungen der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration können somit die Aktivität Calmodulin-gesteuerter Enzymsysteme verändern. LASSEN et al. (1980) halten es für möglich, daß die Erhöhung der Aktivität der Ca-Mg-ATPase und der Übergang der K^+-Kanäle zum hoch leitfähigen Zustand eine gemeinsame Ursache haben und deshalb parallel zueinander auftreten. Für den in ihrem Modell angenommenen Zusammenhang zwischen Calmodulin vermittelter Aktivierung der ATPase und Ca^{2+}-induzierter K^+-Leitfähigkeit sprechen experimentelle Befunde, die zeigen, daß nach Entzug von Calmodu-

lin eine Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration nicht zu einer Erhöhung der K^+-Leitfähigkeit führt, während die Zugabe von Cytoplasmaextrakt, welcher Calmodulin gelöst enthält, Ca^{2+}-empfindliche K^+-Kanäle induziert (LASSEN et al., 1980). Diese Experimente wurden an "Inside-Out-Vesicles" durchgeführt. Einen Beweis für einen direkten Zusammenhang stellen diese Experimente jedoch nicht dar. Denkbar wäre auch, daß durch Calmodulin andere Enzyme aktiviert werden, wodurch z.B. Phosphorylierungen von Membranbestandteilen beeinflußt werden könnten.

Abb. 31 faßt in einem Schema die diskutierten Hypothesen zusammen, die auch für den erschöpften Skelettmuskel ein Modell für die Entstehung der hohen K^+-Leitfähigkeit darstellen könnten.

Fragt man nach einer physiologischen Bedeutung einer Ca^{2+}-induzierten K^+-Leitfähigkeitserhöhung, die mit dem Absinken der Energievorräte einhergeht oder von ihr ausgelöst wird, so mag man zuerst an eine Schutzfunktion für die Zelle denken. Eine hohe K^+-Leitfähigkeit würde das Membranpotential auf einem negativen Wert stabilisieren, die Erregbarkeit der Zelle herabsetzen und damit eine weitere Erschöpfung verhindern. Die Erregbarkeit der Zelle würde somit wesentlich durch die Energievorräte beeinflußt und geregelt.

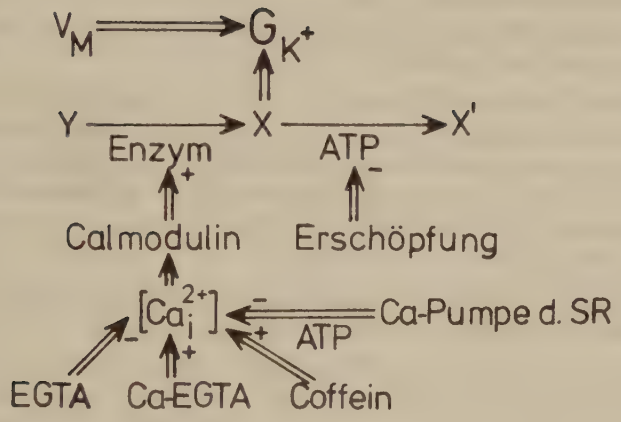


Abb. 31

Hypothetisches Modell zur Entstehung einer Ca^{2+}-induzierten K^+-Leitfähigkeitserhöhung in stoffwechselvergifteten und energieerschöpften Skelettmuskelfasern

Die Anreicherung eines Stoffwechselmetaboliten (X) führt zur Erhöhung der K^+-Leitfähigkeit (G_{K^+}). Ca-Calmodulin vermittelt die Bildung von X aus einer nicht wirksamen Vorstufe (Y). Unter Verbrauch von Stoffwechselenergie (ATP) wird X in ein ebenfalls unwirksames Stoffwechselprodukt (X') umgewandelt. Die größte G_{K^+}-Erhöhung wird durch die Kombination von ATP-Verarmung und gleichzeitiger Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration ausgelöst.

5. Zusammenfassung

Die vorliegenden voltage-clamp Untersuchungen zur K^+-Leitfähigkeit von Frosch-Skelettmuskelfasern (M. sartorius; Rana temporaria) betrafen zwei Aspekte:

A) Zum einen wurden Experimente zur blockierenden Wirkung von Aminopyridinen (hauptsächlich 4-AP) nach extra- und intrazellulärer Zugabe sowie zur Wirkung von Tetraethylammonium nach intrazellulärer Zugabe auf die Kaliumleitfähigkeit des verzögerten Gleichrichters (delayed rectifier) normaler Skelettmuskelfasern durchgeführt.

B) Zum anderen wurde die permanent aktivierte K^+-Leitfähigkeit stoffwechselvergifteter und energieerschöpfter Skelettmuskelfasern untersucht. Im Vordergrund stand hierbei neben der Reversibilität die Frage nach der Abhängigkeit der hohen Membranleitfähigkeit erschöpfter Fasern von der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Es wurde die Wirkung von EGTA und Ca-EGTA Injektionen und die von Coffein nach extrazellulärer Zugabe untersucht.

Die intrazelluläre Applikation erfolgte durch iontophoretische Injektion über eine Glasmikroelektrode. Mit Hilfe eines Diffusionsmodells wurde die intrazelluläre Konzentration der injizierten Substanzen am Ort der Messung abgeschätzt.

Zu A) Bei extrazellulärer Zugabe von 1 mM 4-AP war die blockierende Wirkung auf den verzögerten Gleichrichter nach ca. 15 min maximal und betrug ca. 80 % der Kontrollströme unter Berücksichtigung linearer Leitfähigkeitsanteile (Leckleitfähigkeit, Chloridleitfähigkeit). Die blockierende Wirkung war am Ganzmuskelpräparat nach 15minütiger Inkubation irreversibel. Da 4-AP durch die Blockierung des verzögerten Gleichrichters die Repolarisationsphase des Aktivierungspotentials verlängert, erhöht es die Kontraktionskraft bei extrazellulärer Reizung. Mit Kontraktionskraftmessungen an Einzelfasern konnte die vollständige Reversibilität dieser 4-AP Wirkung gezeigt werden. Bei 1 mM 4-AP war die Kontraktionskraft erhöhende Wirkung nach 6 min maximal, bei 5 mM 4-AP nach etwa

1.5 min. Nach 5 mM 4-AP ging sie in 4-AP freier Badlösung innerhalb von 30 min um 95 % zurück.

Untersuchungen bei hoher Kaliumaußenkonzentration (100 mM) zeigten, daß 4-AP (1 mM) möglicherweise einen geringen blockierenden Effekt auf den Einwärtsgleichrichter von 10 - 20 % hat.

2- und 3-Aminopyridin zeigten ähnliche Wirkungen wie 4-AP. 5 mM 2-AP führte zur nahezu vollständigen Blockierung des verzögerten Gleichrichters. 1 mM 3-AP verlangsamte deutlich die Aktivierungsphase des verzögerten Gleichrichters.
Unterschiede in den Wirkungen der verschiedenen Aminopyridine beruhen möglicherweise auf dem unterschiedlichen Verhältnis von geladenen und ungeladenen Molekülen bei physiologischem pH. Ungeladene Moleküle könnten die Membran passieren und intrazellulär wirken.
Durch die extrazelluläre Zugabe von Aminopyridin konnte eine eindeutige Aussage über eine mögliche intrazelluläre Wirkung nicht getroffen werden.

Durch Injektion von 4-AP wurde die Annahme einer intrazellulären Wirkung direkt überprüft. Die "steady-state" Blockierung des verzögerten Gleichrichters war konzentrationsabhängig und betrug maximal 90 % unter Berücksichtigung linearer Leitfähigkeitsanteile. Die 4-AP Wirkung war charakterisiert durch eine stark beschleunigte "Inaktivierung" des verzögerten Gleichrichters. Die "Inaktivierungsverläufe" konnten durch einfache e-Funktionen angepaßt werden. Die Zeitkonstante war annähernd umgekehrt proportional zur intrazellulären Konzentration. "Steady-state" Blockierung als auch beschleunigte "Inaktivierung" konnten mit einer 1 : 1 Reaktionskinetik zwischen 4-AP Molekül und K^+-Kanal beschrieben werden unter der Annahme, daß 4-AP nur offene Kanäle blockiert. Es wurde eine Dissoziationskonstante von $1.1 \cdot 10^{-5}$ M bestimmt.

Auch Tetraethylammonium blockiert den verzögerten Gleichrichter nach intrazellulärer Zugabe. Allerdings wurde im Vergleich zu 4-AP gleiche Blockierung erst bei 6-fach höherer Konzentration

erzielt. Die TEA-Wirkung konnte ebenfalls gut mit einer 1 : 1-Reaktionskinetik erklärt werden. Für die Dissoziationskonstante K_D wurde ein Wert von $6.7 \cdot 10^{-5}$ M ermittelt. Dieser Wert liegt ca. 120-fach niedriger als für die Wirkung von TEA bei extrazellulärer Zugabe ($8 \cdot 10^{-3}$, STANFIELD, 1970).

Die Wirkung von 4-AP und TEA auf den verzögerten Gleichrichter von Skelettmuskelfasern sind der Wirkung verschiedener TEA-Derivate am 'late-channel' des Riesenaxons vom Tintenfisch sehr ähnlich (ARMSTRONG, 1975) und lassen sich gut mit den ARMSTRONG'schen Vorstellungen vom K^+-Kanal vereinbaren. Möglicherweise werden die K^+-Blocker am K^+-Kanal der Skelettmuskelfaser stärker gebunden als am K^+-Kanal des Riesenaxons. Unterschiede in der Struktur der K^+-Kanäle beider Präparate könnten hierfür verantwortlich sein.

Zu B) Stoffwechselvergiftete Skelettmuskelfasern, deren Energiereserven durch repetitive Reizung erniedrigt wurden, zeigen einen Zustand permanent aktivierter hoher Kaliumleitfähigkeit. Bislang wurde nur der irreversible Übergang zur hohen Kaliumleitfähigkeit beschrieben (FINK, 1978). Durch eine veränderte Erschöpfungsmethode unter der ausschließlichen Verwendung von Cyanid als Stoffwechselgift (ohne Monojodazetat) wurde ein reversibler intermediärer Erschöpfungszustand gefunden. Der verzögerte Gleichrichter ist in diesem Zustand aktivierbar. Durch intrazelluläre Reizung konnte der Übergang in den permanent aktivierten hohen Leitfähigkeitszustand demonstriert werden.

Ausgehend vom reversiblen intermediären Zustand der Erschöpfung wurden Versuche zur Veränderung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration unternommen:

1. Durch Injektion von EGTA wurde der Übergang vom Zustand der Aktivierbarkeit des verzögerten Gleichrichters zum Zustand permanent aktivierter hoher Membranleitfähigkeit verhindert. Bei Anwesenheit von EGTA inaktivierte der verzögerte Gleichrichter wie

in normalen Fasern bei wiederholter Aktivierung. Der Effekt der EGTA-Injektion war reversibel.

2. Zugabe von Coffein (1.5 mM) zur Badlösung bewirkte im Verlauf von ca. 10 min eine spontane Erhöhung der Membranleitfähigkeit ohne intrazelluläre Reizung. Die Wirkung von Coffein war nach ca. 20 min in coffeinfreier Badlösung weitgehend reversibel.

3. Durch Injektion von einem EGTA/Ca-EGTA Gemisch (eingestellt auf eine freie Ca^{2+}-Konzentration von 10^{-5} M) konnte wenige Sekunden nach Ende einer Injektion eine Leitfähigkeitserhöhung registriert werden. Die Effekte von Ca-EGTA waren - nach einer Pause von wenigen min - vollständig reversibel.

Die Konzentrationsänderungen der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration wurden mit Hilfe des angenommenen Diffusionsmodells abgeschätzt. Danach konnte sie durch die EGTA- und Ca-EGTA Injektion in einem Bereich zwischen $5 \cdot 10^{-9}$ und $1.5 \cdot 10^{-6}$ M variiert werden.

Die Untersuchungen unterstützen die Vorstellung, daß in erschöpften Skelettmuskelfasern neben einer ATP-Verarmung eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zur Leitfähigkeitserhöhung für Kaliumionen führt. Sie lassen sich mit der Annahme vereinbaren, daß hauptsächlich Kanäle des verzögerten Gleichrichters bei Energiemangel und Ca^{2+}-Anreicherung im Zustand permanenter Aktivierung verharren.

Die Versuche sprechen für eine enge Verknüpfung zwischen K^+-Leitfähigkeit und Stoffwechsellage und deuten möglicherweise auf einen physiologisch sinnvollen Schutzmechanismus hin. Dieser könnte darin bestehen, daß bei Energiemangel über eine Erhöhung der K^+-Leitfähigkeit die Erregbarkeit von Skelettmuskelfasern herabgesetzt wird, bis sich die Stoffwechselsituation normalisiert hat.

6. Literaturverzeichnis

ABRAMOWITZ, M. & STEGUN, I.A. (1972): Handbook of mathematical functions. National bureau of standards, Washington, D.C.

ADRIAN, R.H. (1956): The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle. J. Physiol. 133, 631-658.

ADRIAN, R.H. (1964): The rubidium and potassium permeabilities of frog muscle membrane. J. Physiol. 175, 134-159.

ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. & HODGKIN, A.L. (1970a): Voltage clamp experiments in striated muscle fibres. J. Physiol 208, 607-644.

ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. & HODGKIN, A.L. (1970b): Slow changes in potassium permeability in skeletal muscle. J. Physiol. 208, 645-668.

ADRIAN, R.H. & FREYGANG, W.H. (1962): Potassium conductance of frog membrane under controlled voltage. J. Physiol. 163, 104-114.

AICKIN, C.C. & THOMAS, R.C. (1977): Micro-electrode measurement of the intracellular pH and buffering power of mous soleus muscle fibres. J. Physiol. 267, 791-810.

ALLAN, D. & MICHELL, R.H.(1975): Accumulation of 1,2-diacylglycerol in the plasma membrane may lead to echinocyte transformation of erythrocytes. Nature 258, 348-349.

ALLAN, D. & MICHELL, R.H. (1977): Calcium ion-dependent diacylglycerol accumulation in erythrocytes is associated with microvesiculation but not with efflux of potassium ions. Biochem. J. 166, 495-499.

ALMERS, W. (1976): Differential effects of tetracaine on delayed potassium channels and displacement currents in frog skeletal muscle. J. Physiol. 262, 613-637.

ALMERS, W. & LEVINSON, S.R. (1975): Tetrodotoxin binding to normal and depolarized frog muscle and the conductance of a single sodium channel. J. Physiol. 247, 483-509.

ARMSTRONG, C.M. (1966): Time course of TEA^+-induced anomalous rectification in squid giant axons. J.gen.Physiol. 50, 491-503.

ARMSTRONG, C.M. (1969): Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. J.gen.Physiol. 54, 553-575.

ARMSTRONG, C.M. (1971): Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. J.gen.Physiol. 58, 413-437.

ARMSTRONG, C.M. (1975a): Ionic pores, gates, and gating currents Q.Rev.Biophys. 7, 179-210.

ARMSTRONG; C.M. (1975b) Potassium pores of nerve and muscle membranes. In: Membranes: A series of advances 3. Eisenman, G. (ed.). New York: Marcel Dekker, 325-358.

ARMSTRONG, C.M. & BINSTOCK, L. (1965): Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium-chloride. J.gen.Physiol. 48, 859-872.

ARMSTRONG, C.M. & HILLE, B. (1972): The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. J.gen.Physiol. 59, 388-400.

AUDIBERT-BENOIT, M.L. (1972): Effets de l'injection intracellulaire d'ions tétraéthylammonium sur le potentiel d'action de la fibre musculaire striée de Grenouille. J.Physiol., Paris 65, 338A.

AUDIBERT-BENOIT, M.L. (1973): Effets d'une injection intracellulaire d'ion tétraéthylammonium sur la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire de Grenouille. J.Physiol., Paris 67, 330A.

AXELSON, J. & THESLEFF, S. (1958): Activation of the contractile mechanism in striated muscle. Acta physiol.scand. 44, 55-66.

BIANCHI, C.P. (1961): The effect of caffeine on radiocalcium movement in frog sartorius. J.gen.Physiol. 44, 845-858.

BIANCHI, C.P. (1962): Kinetics of radiocaffeine uptake and release in frog sartorius. J.Pharmac.exp.Ther. 138, 41-47.

BREMEL, R.D. & WEBER, A. (1975): Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. Biochem.Biophys. Acta 376, 366-374.

CARSLAW, H.S. & JAEGER, J.C. (1959): Conduction of heat in solids. 2nd.ed.Clarendon Press, Oxford.

CHEUNG, W.Y., LYNCH, T.J. & WALLACE, R.W. (1978): An endogenous Ca^{++}-dependent activator protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase. In: Advan.Cycl. Nucleotide Res., vol.9, Ed.: George, W.J. & Ignarro, L.J. pp. 233-251.

CHEUNG, W.Y. (1980): Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science, 207, 19-27.

COLE, K.S. (1961): Non-linear current-potential relations in an axon-membrane. J.gen.Physiol. 44, 1055-1057.

COSTANTIN, L.L. (1968): The effect of calcium on contraction and conductance threshold in frog skeletal muscle. J.Physiol. 195, 119-132.

COSTANTIN, L.L. (1977): Activation in striated muscle. In: Handbook of Physiology, Section 1: The nervous system, Vol. 1, Part. 1. Vol. Ed.: Kandel, E.R.
American Physiological Society, Bethesda, Maryland.

CRANK, J. (1975): The mathematics of diffusion. 2nd.ed.Clarendon Press, Oxford.

EDWARDS, C., RITCHIE, J.M. & WILKIE, D.R. (1956): The effect of some cations on the active state of muscle. J.Physiol. 133, 412-419.

EISENBERG, R.S. & GAGE, P. (1969): Ionic conductances of the surface and transverse tubular membranes of frog sartorius fibres. J.gen.Physiol. 53, 279-297.

ENDO, M. (1966): Entry of fluorescent dye into the sarcotubular system of the frog muscle. J.Physiol. 185, 224-238.

ENDO, M. (1977): Calcium release from sarcoplasmic reticulum. Physiol.Rev. 57, 71-108.

FINK, R. (1975a): Der Membranwiderstand stoffwechselvergifteter und erschöpfter Skelettmuskelfasern. Diplomarbeit, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum.

FINK, R. (1975b): A large increase in potassium conductance of poisoned and exhausted skeletal muscle fibres. Pflügers Arch. 359, R71.

FINK, R. (1978): Die Modifizierung aktivierbarer Kaliumkanäle bei Erschöpfung der Stoffwechselenergie. Dissertation, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum.

FINK, R., GROCKI, K. & LÜTTGAU, H.Ch. (1980a): The effect of energy deprivation and hyperosmolarity upon tubular structures and electrophysiological parameters of muscle fibres. Europ.J.Cell Biol. 21, 101-108.

FINK, R., GROCKI, K. & LÜTTGAU, H.Ch. (1980b): Na/K selectivity, ion conductances and net fluxes of K^+ and Na^+ in metabolically exhausted muscle fibres. Europ.J.Cell Biol.21, 109-115.

FINK, R., GROCKI, K., LÜTTGAU, H.Ch. & WETTWER, E. (1977): The high potassium conductance of exhausted frog muscle fibres. Proc.Int.Union.Physiol.Sci. 13, 227.

FINK, R. & LÜTTGAU, H.Ch. (1976): An evaluation of the membrane constants and the potassium conductance in metabolically exhausted muscle fibres. J.Physiol. 263, 215-238.

FINK, R. & WETTWER, E. (1978): Modified K-channel gating by exhaustion and the block by internally applied TEA^+ and 4-aminopyridine in muscle. Pflügers Arch. 374, 289-292.

GAGE, P.W. & EISENBERG, R.S. (1969): Action potentials, after-potentials, and excitation-contraction coupling in frog sartorius fibres without transverse tubules. J.gen.Physiol. 53, 298-310.

GAY, L.A. & STANFIELD, P.R. (1977): Cs^+ causes a voltage-dependent block of inward K-currents in resting skeletal muscle fibres. Nature 267, 169-170.

GAY , L.A. & STANFIELD, P.D. (1978): The selectivity of the delayed potassium conductance of frog skeletal muscle fibres. Pflügers Arch. 378, 177-179.

GILLESPIE, J.I. (1977): Voltage-dependent blockage of the delayed potassium current in skeletal muscle by 4-aminopyridine. J.Physiol. 273, 64P.

GILLESPIE J.I. & HUTTER, O.F. (1975): The actions of 4-aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. J.Physiol. 252, 70-71P.

GOMOLLA, K.M. (1980): Die Wirkung von Perchlorat auf die elektromechanische Kopplung. Staatsexamensarbeit, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum.

GRABOWSKI, W., LOBSIGER, E.A. & LÜTTGAU, H.Ch. (1972): The effect of repetitive stimulation at low frequencies upon the electrical and mechanical activity of single muscle fibres. Pflügers Arch. 334, 222-239.

HARVEY, A.L. & MARSHALL, I.G. (1977): The facilitatory actions of aminopyridines and tetraethylammonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 299, 53-60.

HASE, S. (1978): Untersuchungen zur Wirkung von Stoffwechselgiften auf elektrische und kontraktile Eigenschaften des Skelettmuskels. Staatsexamensarbeit, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum.

HERZ, R. & WEBER, A. (1965): Caffeine inhibition of Ca uptake by muscle reticulum. Fedn.Proc. 24, 208.

HILLE, B. (1967): The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. J.gen.Physiol. 50, 1287-1302.

HILLE, B. (1968): Pharmacological modifications of the sodium channel of frog nerve. J.gen.Physiol. 51, 199-219.

HILLE, B. (1970): Ionic channels in nerve membranes. Progr. Biophys.Mol.Biol. 21, 1-32.

HILLE, B. (1973): Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations. J.gen.Physiol. 61, 669-686.

HILLE, B. (1975): Ionic selectivity of Na and K channels of nerve membranes. In: Membranes, a series of advances. 3. G. Eisenman, ed., Marcel Dekker, New York, 255-323.

HINZEN, D.H. & TAUC, L. (1977): Membrane properties of Aplysia neurones intracellularly injected with phospholipases A and C. J.Physiol. 268, 21-34.

HIRONAKA, T. & MORIMOTO, S. (1979): The resting membrane potential of frog sartorius muscle. J.Physiol. 297, 1-8.

HODGKIN, A.L. & HOROWICZ, P. (1957): The differential action of hypertonic solutions on the twitch and action potential of a muscle fibre. J.Physiol. 136, 17 P.

HODGKIN, A.L. & HOROWICZ, P. (1959): The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. J.Physiol. 148, 127-160.

HODGKIN, A.L. & HUXLEY, A.P. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, J.Physiol. 117, 500-544.

HODGKIN, A.L. & NAKAJIMA, S. (1972a): The effect of diameter on the electrical constants of frog skeletal muscle fibres. J.Physiol. 221, 105-120.

HODGKIN, A.L. & NAKAJIMA, S. (1972b): Analysis of the membrane capacity in frog muscle. J.Physiol. 221, 121-136.

HORN, A.S., LAMBERT, J.J. & MARSHALL, I.G. (1979): A comparison of the facilitatory actions of 4-aminopyridine methiodide and 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. Br.J. Pharmac. 65, 53-62.

HOWARTH, J.V. (1958): The behavior of frog muscle in hypertonic solutions. J.Physiol. 144, 167-175.

HUTTER, O.F. (1969): Potassium conductance of skeletal muscle treated with formaldehyde. Nature, Lond. 224, 1215-1217.

HUTTER, O.F. & NOBLE, D. (1960): The chloride conductance of frog skeletal muscle. J.Physiol. 151, 89-102.

HUTTER, O.F. & WILLIAMS, T.L. (1979): A dual effect of formaldehyde on the inwardly rectifying potassium conductance in skeletal muscle. J.Physiol. 286, 591-606.

ILLES, P. & THESLEFF, S. (1978): 4-aminopyridine and evoked transmitter release from motor nerve endings. Br.J.Pharmac. 64, 623-629.

ISENBERG, G. (1977a): Cardiac purkinje fibres. Resting, action and pacemaker potential under the influence of $[Ca^{2+}]_i$ as modified by intracellular injection techniques. Pflügers Arch. 371, 51-59.

ISENBERG, G. (1977b): Cardiac purkinje fibres. The slow inward current component under the influence of modified $[Ca^{2+}]_i$. Pflügers Arch. 371, 61-69.

ISENBERG, G. (1977c): Cardiac purkinje fibres. $[Ca^{2+}]_i$ controls steady state potassium conductance. Pflügers Arch. 371, 71-76.

ISENBERG, G. (1977d): Cardiac purkinje fibres. $[Ca^{2+}]_i$ controls the potassium permeability via the conductance-components g_{k1} and g_{k2}. Pflügers Arch. 371, 77-85.

KAO, C.Y. & STANFIELD, P.R. (1968): Actions of some anions on electrical properties and mechanical threshold of frog twitch muscle. J.Physiol. 198, 291-309.

KAO, C.Y. & STANFIELD, P.R. (1970): Actions of some cations on the electrical properties and mechanical threshold of frog sartorius muscle fibres. J.gen.Physiol. 55, 620-639.

KATZ, B. (1949): Les constantes électriques de la membrane du muscle. Arch.Sciences Physiol. 2, 285-299.

KATZ, B. & MILEDI, R. (1969): Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. J.Physiol. 203, 689-706.

KENYON, J.L. & GIBBONS, W.R. (1979): Influence of chloride, potassium and tetraethylammonium on the early outward currend of sheep cardiac purkinje fibres. J.gen.Physiol. 73, 117-138.

KHAN, A.R & EDMANN, K.A.P. (1979): Effects of 4-aminopyridine on the excitation-contraction coupling in frog and rat skeletal muscle. Acta Physiol.Scand. 105, 443-452.

KIRSCH, G.E. & NARAHASHI, T. (1978): 3,4-diaminopyridine. A potent new potassium channel blocker. Biophys.J. 22, 507-512.

KIRSCH, G.E., NICHOLS, R.A. & NAKAJIMA, S. (1977): Delayed rectification in the transverse tubules. Origin of the late after-potential in frog skeletal muscle. J.gen. Physiol. 70, 1-22.

KLEE, M.R. (1978): Tetraethylammonium and 4-aminopyridine distinguish between two types of aplysia neurones. J.Physiol. 284, 125 P.

LANDOLT - BÖRNSTEIN (1960): Zahlenwerte u. Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik u. Technik. Band II, 7.Teil: Elektrische Eigenschaften II. sechste Aufl. Ed.: Hellwege, K.H.; Hellwege A.M.; Schäfer, K.; Lax, E. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

LASSEN U.V., PAPE, L. & VESTERGAARD-BOGIND, B. (1980): Calcium related transient changes in membrane potential of red cell. In: Membrane transport in erythrocytes Alfred Benzon Symposium 14. Ed.: Lassen, U.V.; Ussing, H.H.; With, J.O.. Munksgaard, Copenhagen.

LEW, V.L., BOOKCHIN, R.M., BROWN, A.M. & FERREIRA, H.G. (1980): Ca-sensitivity modulation. In: Membrane transport in erythrocytes. Alfred Benzon Symposium 14. Ed.: Lassen, U.V.; Ussing, H.H.; Wieth, J.O..Munksgaard, Copenhagen.

LEW, V.L. & FERREIRA, H.G. (1976): Variable Ca sensitivity of a K-selektive channel in intact red-cell membranes. Nature 263, 336-338.

LEW, L.V. & FERREIRA, H.G. (1978): Calcium transport and the properties of a calcium-activated potassium channel in red cell membranes. In: Current topics in membranes and transport, Vol. 10. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London.

LUNDH, H., LEANDER, S. & THESLEFF, S. (1977): Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat. The effects of tetraethylammonium guanidine and 4-aminopyridine. J.Neurol.Sci. 32, 29-42.

LUNDH, H. & THESLEFF, S. (1977): The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. Eur.J.Pharmacol. 42, 411-412.

LÜTTGAU, H.Ch. (1965): The effect of metabolic inhibitors on the fatigue of the action potential in single muscle fibres. J.Physiol. 178, 45-67.

LÜTTGAU; H.Ch. & MOISESCU, G.D. (1978): Ion movements in skeletal muscle in relation to the activation of contraction. In: Physiology of membrane disorders. ed. Andreoli, T.E., Hoffman, J.F.; Fanestil, D.. Plenum Publishing Corporation, New York. S. 493-515.

LÜTTGAU, H.Ch. & OETLIKER, H. (1968): The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres. J.Physiol. 194, 51-74.

MEECH, R.W. (1978): Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 7, 1-18.

MEVES, H., & PICHON, Y. (1977): The effect of internal and external 4-aminopyridine on the potassium currents in intracellularly perfused squid giant axons. J.Physiol. 268, 511-532.

MOISESCU, D.G. & THIELECZEK, R. (1978): Calcium and strontium concentration changes within skinned muscle preparations following a change in the external bathing solution. J.Physiol. 275, 241-262.

MOISESCU, D.G. & THIELECZEK, R. (1979): Sarcomere length effects on the Sr^{2+}- and Ca^{2+}-activation curves in skinned frog muscle fibres. Biochim.Biophys.Acta 546, 64-76.

MOLGO, J. (1978): Voltage-clamp analysis of the sodium and potassium currents in skeletal muscle fibres treated with 4-aminopyridine. Experientia 34, 1275-1277.

NARAHASHI, T. (1974): Chemicals as tools in the study of excitable membranes. Physiol.Rev. 54, 813-889.

NOBLE, D. & TSIEN, R.W. (1968): The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac purkinje fibres. J.Physiol. 195, 185-214.

PEACHY, L.D. & SCHILD, R.F. (1968): The distribution of the T-system along the sarcomeres of frog and toad sartorius muscles. J.Physiol. 194, 249-258.

PELHATE, M., HUE, B., PICHON, Y. & CHANELET, J. (1974): Action de la 4-amino-pyridine sur la membrane de l'axone isolé d'insecte. C.R.Acad.Sci. (Paris) 278, Ser.D, 2807-2809.

PELHATE, M. & PICHON, Y. (1974): Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach. J.Physiol 242, 90-91 P.

ROBINSON, R.H. & STOKES, R.H. (1968): Electrolyte solutions. The measurement and interpretation of conductance, chemical potential and diffusion in solutions of simple electrolytes. 2 ed.rev. Butterworth, London.

SIGWORTH, F.J. & NEHER, E. (1980): Single Na^{+} channel currents observed in cultured rat muscle cells. Nature 287, 447-449.

SPIECKER, W. (1976): Untersuchungen über die Rolle der Ca-Ionen in der elektromechanischen Kopplung von Skelettmuskelfasern. Diplomarbeit, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum.

SPIECKER, W. (1980): Der Einfluß der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration auf mechanische und elektrophysiologische Eigenschaften der Skelettmuskelfasern des Frosches. Dissertation, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum.

STANDEN, N.B. & STANFIELD, P.R. (1980): A potential- and time-dependent blockade of inward rectification in frog skeletal muscle fibres by barium and strontium ions. J. Physiol. 280, 169-191.

STANFIELD, P.R. (1970a): The effect of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle. J.Physiol. 209, 209-229.

STANFIELD, P.R. (1970b): The differential effects of tetraethylammonium and zinc ions on the resting conductance of frog skeletal muscle. J.Physiol. 209, 231-256.

STANFIELD, P.R. (1975): The effect of zinc ions on the gating of the delayed potassium conductance of frog sartorius muscle. J.Physiol. 251, 711-735.

STEFANI, E. & SCHMIDT, H. (1972): A convenient method for repeated intracellular recording of action potentials from the same muscle fibre without membrane damage. Pflügers Arch. 334, 276-278.

STEIN, W.D. (1967): The movements of molecules across cell membranes. Academic Press, New York, London.

STOYANOV, E., VULCHER, P., SHTURBOVA, M. & MARINOVA, M. (1976): Clinical electromyomechanographic and electromyographic studies in decurarization with pymadine. Anaesth.Resus. Inten.Therap.4, 139-142.

THOMAS, R.C. (1976): The effect of carbon dioxide on the intracellular pH and buffering power of snail neurones. J.Physiol. 255, 715-735.

ULBRICHT, W. & WAGNER, H.H. (1976): Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. Pflügers Arch. 367, 77-87.

VIERHAUS, J. & ULBRICHT, W. (1971): Rate of action of tetraethylammonium ions on the duration of action potential in single ranvier nodes. Pflügers Arch. 326, 88 - 100.

VOLLE, R.L., GLISSON, S.H. & HENDERSON, E.G. (1972): Blockade by tetraethylammonium (TEA) and rubidium of potassium exchange in sartorius muscle fibers: distribution of 14C-TEA in muscle. Pflügers Arch. 333, 281-296.

WETTWER, E. (1975): Voltage-clamp Technik. Aufbau einer Apparatur zur Messung von Kalium-Strömen an Skelettmuskelfasern. Diplomarbeit, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum.

WETTWER, E., HASE, S. & LÜTTGAU, H.Ch. (1980): The increase in potassium conductance in metabolically poisoned skeletal muscle fibres. Proc.Int.Union.Physiol.Sci. 14, 785.

WETTWER, E., HASE, S. & LÜTTGAU, H.Ch. (1981): The increase in potassium conductance in metabolically poisoned skeletal muscle fibres. Adv.Physiol.Sci.Vol.5.Molecular and cellular aspects of muscle function. 263-269. Ed.: Varga, E., Köver, A., Kovacs, T., Kovacs, L. Akadémiai Kiadó, Budapest.

WILKIE, D.R. (1968): Muscle. Studies in Biology no.11. Edward Arnold Ltd. Camelot Press, London and Southampton.

YEH, J.Z., OXFORD, G.S., WU, C.H. & NARAHASHI, T. (1976a): Dynamics of aminopyridine block of potassium channels in squid axon membrane. J.gen.Physiol. 68, 519-535.

YEH, J.Z., OXFORD, G.S., WU, C.H. & NARAHASHI, T. (1976b): Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid giant axon membranes. Biophys.J. 16, 77-81.

ZACHAR, J. (1971): Electrogenesis and contractility in skeletal muscle cells. University Park Press, Baltimore, London.

Ich danke Herrn Professor Dr. H. Ch. Lüttgau für seine weitreichende Unterstützung und hilfreichen Diskussionen. Mein Dank gilt insbesondere Herrn Dr. G. Boheim und Herrn Dr. H. Pusch sowie meinen Kollegen und Freunden Frau Dr. W. Spiecker, Herrn Dr. W. Melzer und Herrn R. Thieleczek für wertvolle Hinweise und Ratschläge. Herrn M. Gomolla danke ich für die Präparation von Einzelfasern, Frau U. Dörstelmann und Herrn G. Gottschalk für ihre Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau M. Bayreuther für die rasche und sorgfältige Fertigstellung der Reinschrift bedanken.

Lebenslauf

Geboren	11. Mai 1950	
Geburtsort	Minden/Westfalen	
Schulbesuch	1956 - 1961	Volksschule
	1961 - 1964	Gymnasium
	1964 - 1966	Realschule
	1966 - 1969	Aufbaugymnasium
Studium und Ausbildung	1969 - 1975	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
	1975	Diplom in Biologie
	seit 1975	Dissertation am Lehrstuhl für Zellphysiologie der Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum
	seit 1977	Studium der Human-Medizin an der Ruhr-Universität Bochum

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545 / 8791